



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

“DETECÇÃO DE ALTO NÍVEL DE RESISTÊNCIA A AMINOGLICOSÍDEOS EM ESTIRPES
CLÍNICAS DE ENTEROCOCCI”

MARLENE PATRÍCIA PEREIRA FERREIRA DELGADO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira

São Braz

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

“DETECÇÃO DE ALTO NÍVEL DE RESISTÊNCIA A AMINOGLICOSÍDEOS EM ESTIRPES
CLÍNICAS DE ENTEROCOCCI”

MARLENE PATRÍCIA PEREIRA FERREIRA DELGADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

Doutora Maria Constança Matias
Ferreira Pomba

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias
Ferreira Pomba

2015
LISBOA

Ao meu filho Diogo

Agradecimentos

O meu muito obrigado a todos aqueles que ao longo do tempo me apoiaram, ajudaram e motivaram na elaboração desta tese, especialmente:

- À minha orientadora Professora Doutora Maria Constança Pomba, pelo seu apoio, compreensão, disponibilidade, paciência e amizade incomensuráveis durante a realização desta dissertação, por nunca ter desistido de mim, por todo o conhecimento transmitido, e por ter despertado em mim a paixão pela investigação e pela antibioresistência ao longo dos excelentes anos de trabalho no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte.
- Ao Professor Doutor José Henrique Duarte Correia e à professora Doutora Maria Teresa Villa de Brito por todo o apoio e ensinamentos transmitidos ao longo dos anos de trabalho no laboratório.
- À Professora Doutora Isabel Neto pelos seus preciosos ensinamentos na área da estatística.
- A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte, especialmente ao Mestre Bruno Baptista, à Mestre Marta Costa e à Dra. Salomé Gonçalves, por todo o apoio, ensinamentos, amizade e camaradagem.
- À D. Isalinda Miraldo pela compreensão e pelo apoio na elaboração da última fase do trabalho prático.
- À Iris Santos pela sua amizade e carinho, pelo apoio, incentivo e por me chatear insistentemente para que terminasse a minha tese.
- Às pessoas mais importantes da minha vida: a minha família, a minha mãe Isabel, o meu pai José, o meu irmão Tiago e o meu marido Edgar, pelo amor e apoio incondicional, por estarem sempre lá, pela força, motivação, incentivo, pelos puxões de orelhas merecidos e pela felicidade de cada dia; e ao meu filho Diogo, a luz dos meus dias, pela força e motivação necessárias para terminar este projecto.

RESUMO - Detecção de alto nível de resistência a aminoglicosídeos em estirpes clínicas de enterococci

Os *Enterococcus* emergiram como agentes patogénicos nosocomiais importantes, com o aparecimento cada vez mais frequente de estirpes multi-resistentes. São intrinsecamente resistentes a várias classes de antibióticos, por exemplo as cefalosporinas, baixas concentrações de aminoglicosídeos, lincosamidas e estreptograminas (*Enterococcus faecalis*). Adicionalmente, apresentam capacidade de adquirir resistência a outros antibióticos, sendo cada vez mais frequente a ocorrência de resistência à penicilina, cloranfenicol, macrólidos, tetraciclina, fluoroquinolonas, glicopéptidos e resistência de elevado nível aos aminoglicosídeos, originando graves problemas de tratamento. Desta forma a resistência antimicrobiana em *Enterococcus* é actualmente motivo de grande preocupação. Este estudo teve como objectivo avaliar e caracterizar o perfil de susceptibilidade de estirpes clínicas de enterococci e proceder a uma comparação entre os diferentes métodos de avaliação da susceptibilidade. Posteriormente caracterizaram-se os mecanismos moleculares de resistência à gentamicina. Foram analisadas 67 estirpes isoladas entre 1998 e 2008 no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte (FMV - UL). As estirpes foram identificadas pelo sistema BBL Cristal Gram-Positive ID System® e o perfil de susceptibilidade foi avaliado através dos métodos de difusão em disco e ensaios de microdiluição (standard e DADE Microscan) e interpretado de acordo com os critérios Clinical Laboratory Standards Institute. A espécie predominante foi o *Enterococcus faecalis* (86,6%) seguido do *Enterococcus faecium* (9,0%). Nenhuma das estirpes apresentou resistência à vancomicina, teicoplanina e linezolid. A susceptibilidade foi elevada relativamente à penicilina (91,0%), ampicilina (91,0%), associação amoxicilina/ácido clavulânico (91,0%), cloranfenicol (62,7%), nitrofurantoína (80,6%) e associação trimetoprim/sulfametoxazol (80,6%). A resistência foi elevada relativamente às fluoroquinolonas (\approx 40%), eritromicina (49,3%), tetraciclina (70,2%) e rifampina (43,3%). Foram identificadas oito estirpes resistentes a elevados níveis de gentamicina - HLGR ($> 500\mu\text{g/ml}$) e 23 estirpes resistentes a elevados níveis de estreptomicina - HLSR ($> 1000\mu\text{g/ml}$). Destas, sete apresentavam resistência combinada. A comparação entre os diferentes métodos demonstrou que os discos de alta concentração de gentamicina e estreptomicina são fiáveis, ao contrário dos discos de gentamicina 10 μg , estreptomicina 10 μg e vancomicina 30 μg . A avaliação da resistência aos glicopéptidos deve ser realizada através da determinação da concentração inibitória mínima. A microdiluição em meio Müller-Hinton Broth demonstrou que nem todas as estirpes clínicas apresentam resistência de baixo nível à gentamicina. A caracterização dos mecanismos de resistência demonstrou a presença exclusiva da enzima bifuncional, em todas as estirpes HLGR.

Palavras-chave: *Enterococcus*, resistência antimicrobiana, elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos, enzima bifuncional, genes modificadores da gentamicina, animais de companhia.

ABSTRACT - Detection of high-level aminoglycosides resistance in clinical isolates of enterococci

Enterococci have emerged as important nosocomial pathogens, with the increasing identification of multi-resistant strains. They are intrinsically resistant to several antibiotic classes such as cephalosporins, low concentrations of aminoglycosides, lincosamides and streptogramins (*Enterococcus faecalis*). Additionally, enterococci have the ability to acquire resistance to other antibiotics. Resistance to penicillin, chloramphenicol, macrolides, tetracyclines, fluoroquinolones, glycopeptides and high-level of resistance to aminoglycosides, has been increasingly reported, originating serious treatment problems. For this reason, antimicrobial resistance in *Enterococcus* is now a major concern. The aim of this study was to evaluate and characterize the antimicrobial susceptibility patterns of clinical strains of enterococci and to compare different methods for assessing susceptibility. In the final phase of the study, we also characterized the molecular mechanisms gentamicin resistance. Sixty-seven strains were isolated, between 1998 and 2008, in the Clinical Laboratory Professor Braço Forte (FMV - UL). Isolates were identified at species level using BBL Crystal Gram-Positive ID System® and susceptibility testing was performed using disk diffusion method and microdilution assays (standard and DADE Microscan). Clinical Laboratory Standards Institute breakpoints were applied. *Enterococcus faecalis* was the predominant species isolated (86,6%), followed in frequency by *Enterococcus faecium* (9,0%). None of the isolates was resistant to vancomycin, teicoplanin or linezolid. Susceptibility was high towards penicillin (91,0%), ampicillin (91,0%), amoxicillin / clavulanic acid (91,0%), chloramphenicol (62,7%), nitrofurantoin (80,6%) and trimethoprim / sulfamethoxazole (80,6%). Resistance was high towards to quinolones (\approx 40%), erythromycin (49,3%), tetracycline (70,2%) and rifampin (43,3%). Eight high-level gentamicin resistant - HLGR ($> 500\mu\text{g/ml}$) isolates and 23 high-level streptomycin resistant – HLSR ($> 1000\mu\text{g/ml}$) isolates were detected. Seven presented combined resistance. Comparison between the different methods showed that the high-content gentamicin and streptomycin discs are reliable, unlike the $10\mu\text{g}$ gentamicin, $10\mu\text{g}$ streptomycin and $30\mu\text{g}$ vancomycin discs. Glycopeptide susceptibility testing should be performed by minimum inhibitory concentration determination. The Mueller-Hinton Broth microdilution assay demonstrated that not all clinical isolates are resistant to low levels of gentamycin. The characterization of resistance mechanisms showed the presence of only the bifunctional enzyme, in all HLGR isolates.

Keywords: *Enterococcus*, antimicrobial resistance, high-level aminoglycosides resistance, bifunctional enzyme, gentamicin modifying genes, pets.

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
2	Enterococcus – Resistências Naturais e Adquiridas a Antibióticos	5
2.1	Resistência Intrínseca	9
a)	β -Lactâmicos	9
b)	Lincosamidas e Estreptograminas	10
c)	Aminoglicosídeos.....	10
d)	Trimetoprim/sulfametoxazol.....	11
e)	Glicopéptidos.....	11
f)	Fluoroquinolonas	11
2.2	Resistência Adquirida	12
a)	β -Lactâmicos	12
b)	Aminoglicosídeos - Elevado Nível de Resistência (High Level Aminoglycoside Resistance - HLAR).....	12
c)	Glicopéptidos.....	12
d)	Cloranfenicol.....	13
e)	Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do tipo B (antibióticos MLS _B)	14
f)	Tetraciclínas	14
g)	Fluoroquinolonas	15
h)	Oxazolidonas.....	15
3	Elevado Nível de Resistência aos Aminoglicosídeos (High Level Aminoglycoside Resistance - HLAR).....	16
4	Materiais e Métodos	18
4.1	Estirpes de Enterococci provenientes de infecções em animais de companhia	18
4.2	Determinação da susceptibilidade aos antibióticos	19
4.3	Caracterização genotípica das estirpes	22
5	Resultados e Discussão	25
5.1	Caracterização das estirpes	25
5.2	Perfil de susceptibilidade das estirpes	26
5.3	Determinação da susceptibilidade por difusão em disco <i>versus</i> CIM.....	33
5.4	Determinação da susceptibilidade por microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth <i>versus</i> microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.....	37
5.5	Amplificação / identificação do gene que codifica a enzima bifuncional (<i>aac(6')</i> - <i>le-aph(2'')</i> - <i>la</i>) e dos genes modificadores da gentamicina <i>aph(2'')</i> - <i>lb</i> e <i>aph(2'')</i> - <i>ld</i>	39
5.6	Discussão	40

6	Conclusões.....	42
7	Bibliografia.....	44
8	ANEXOS.....	49
8.1	ANEXO 1 - Instruções de utilização DADE MicroScan® para gram positivos	49
8.2	ANEXO 2 – Folha de leitura para DADE MicroScan® para gram positivos com esquema da placa.....	50
8.3	ANEXO 3 – Artigo Publicado “Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats”	51
8.4	ANEXO 4 – Abstract da comunicação oral “Detection and clinical implication of high-level aminoglycoside resistance among clinical enterococci strains isolated from pets”	55
8.5	ANEXO 5 – Abstract da comunicação oral “Antimicrobial resistance of uropathogenic enterococci isolated from pets in Portugal”	56
8.6	ANEXO 6 – Abstract da comunicação oral “Antimicrobial Resistance and Detection of High-level Aminoglycoside Resistance Among Enterococci Isolated From Pets in Portugal”.....	57
8.7	ANEXO 7 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth <i>versus</i> microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de placa de microdiluição.....	20
Figura 2. Imagem de gel de agarose 3% após electroforese dos produtos do PCR da enzima bifuncional (<i>aac(6')</i> - <i>le-aph(2'')</i> - <i>Ia</i>) - (505bp).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resistência intrínseca a antibióticos nos enterococci	7
Tabela 2. Resistência adquirida a antibióticos nos enterococci	8
Tabela 3. Resumo do conjunto de <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes em estudo	24
Tabela 4. Determinação das concentrações inibitórias mínimas com recurso à técnica de microdiluição DADE MicroScan [®] para gram positivos	27
Tabela 5. Comparação entre os métodos de ensaios de microdiluição (CIM) e difusão em disco na detecção de resistência à penicilina, ampicilina, vancomicina e de resistência de elevado nível aos aminoglicosídeos	34
Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de difusão em disco e ensaio de microdiluição (CIM)	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Caracterização da distribuição das amostras de estirpes clínicas recolhidas (n=67) de acordo com a origem da infecção	25
Gráfico 2: Caracterização da distribuição das espécies de enterococci isoladas (n=67), por espécie animal.....	26
Gráfico 3: Susceptibilidade das estirpes clínicas aos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina e associação amoxicilina/ácido clavulânico) - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos	28
Gráfico 4: Susceptibilidade das estirpes clínicas à vancomicina, à teicoplanina e à linezolida - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.....	29
Gráfico 5: Susceptibilidade das estirpes clínicas ao cloranfenicol, à nitrofurantoína e à associação trimetoprim/sulfametoxazol - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos	29
Gráfico 6: Susceptibilidade das estirpes clínicas à ciprofloxacina, à levofloxacina e à moxifloxacina - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos	30
Gráfico 7: Susceptibilidade das estirpes clínicas à eritromicina, à tetraciclina, à rifampina e à associação quinopristina/dalfopristina - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.	31
Gráfico 8: Susceptibilidade das estirpes clínicas a elevados níveis aminoglicosídeos - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.....	32
Gráfico 9: Determinação da CIM da gentamicina pelo método de microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMEs – Enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos

AMC – Amoxicilina + Ácido Clavulânico

AMP – Ampicilina

ATCC - American Type Culture Collection

C - Cloranfencol

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CN – Gentamicina

DANMAP - The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme

ADN - Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENR – Enrofloxacin

FAO - Food and Agriculture Organization

HLGR - High-Level Gentamycin Resistance – Resistência de Elevado Nível à Gentamicina

HLSR - High-Level Streptomycin Resistance – Resistência de Elevado Nível à Estreptomicina

HLAR - High-Level Aminoglycoside Resistance – Resistência de Elevado Nível aos Aminoglicosídeos

I - Intermédio

NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards

K – Canamicina

OIE - Organization for Animal Health

P – Penicilina G

nd – Não realizado

PBPs – Penicillin-binding proteins - Proteínas de ligação às penicilinas

PBS – Phosphate buffer saline – Tampão fosfato salino

PCR - Polymerase Chain Reaction - Reacção em Cadeia da Polimerase

PYR - L-pirrolidono-β-naftilamina

R - Resistente

RNA - Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

rRNA - RNA ribossomal

S - Sensível

STR – Estreptomicina

SVARM - Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring

SXT - Sulfametoxazol + Trimetoprim

TE – Tetraciclina

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos

TSB - Trypticase Soy Broth

UFC – Unidades formadoras de colónia

VA – Vancomicina

WHO – World Health Organization

1 Introdução

Os *Enterococcus* são cocos anaeróbios facultativos, gram-positivos, catalase negativos, que foram inicialmente classificados como pertencentes ao género *Streptococcus*. Apresentam ainda a capacidade de hidrolisar a L-pirrolidonil- β -naftilamina (PYR) e, nos esfregaços, aparecem normalmente aos pares ou sob a forma de cadeias curtas.

Na década de 1930, o sistema serológico de classificação de Lancefield incluiu-os no Grupo D do género *Streptococcus*, devido às suas diferentes características bioquímicas, tendo desta forma sido diferenciados dos restantes Streptococci.

Mais tarde, Shermen (1937) recomendou o uso do termo *Enterococcus* para os microorganismos pertencentes ao género *Streptococcus* que apresentavam a capacidade de se desenvolver a temperaturas que variavam entre os 10 e os 45°C, a pH 9,6 e em meios com elevadas concentrações de NaCl (6,5%), que sobreviviam durante 30 minutos a temperaturas de 60°C e que eram capazes de hidrolisar a esculina na presença de bÍlis.

Em 1984, após estudos de hibridação ADN-ADN e ADN-RNA, e com base nas suas diferenças genéticas, foram reclassificados como *Enterococcus*, passando a formar um novo género (Hollenbeck & Rice, 2012; Murray, 1990; Cetinkaya, Falk & Mayhall, 2000; Ogier & Serror, 2008; Fisher & Phillips, 2009; Nilsson, 2012; Werner et al., 2013).

Os enterococci são microorganismos comensais da microbiota gastrointestinal do Homem e dos animais, e que podem ocasionalmente colonizar a cavidade oral, a vagina e o tracto hepatobiliar. São também microorganismos ubiqutários podendo ser frequentemente encontrados nos alimentos, plantas, água e solos, muito provavelmente como consequência da sua disseminação fecal e da sua resistência natural a condições ambientais adversas (Pai & Kim, 1998; Shepard & Gilmore, 2002; Amyes, 2007; Ogier & Serror, 2008; Fisher & Phillips, 2009; Jackson, Fedorka-Cray, Davis, Barret & Frye, 2009; Ghosh, Dowd & Zurek, 2011; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Werner et al., 2013).

Apesar de terem sido considerados microorganismos com reduzida patogenicidade e impacto clínico, especialmente quando comparados com outros microorganismos gram-positivos, a sua importância como causadores de infecções nosocomiais têm vindo a aumentar. Diversos factores contribuíram para a emergência dos *Enterococcus* como agentes patogénicos importantes, tais como a sua distribuição ubiqutária e capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, o uso frequente de antibióticos de largo espectro, e de cateteres invasivos na prática hospitalar e, especialmente, o aparecimento de estirpes resistentes a uma grande variedade de antibióticos. Adicionalmente, os enterococci possuem ainda a capacidade de, através da transferência de plasmídeos e transposões, trocas cromossómicas e mutações, adquirir resistência a fármacos antimicrobianos para os quais não apresentam resistência intrínseca, e de adquirir factores de virulência e formar biofilmes (Pai & Kim, 1998; Shepard & Gilmore, 2002; Klare, Konstabel, Badstübner, Werner & Witte, 2003; Johnston &

Jaykus, 2004; Amyes, 2007; Jackson et al., 2009; Ghosh et al., 2011; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Nilsson, 2012; Kataoka et al. 2013; Tremblay, Charlebois, Masson & Archambault, 2013).

Actualmente conhecem-se mais de 24 espécies de enterococci, das quais, os *Enterococcus faecalis* e os *Enterococcus faecium* são as espécies responsáveis pela maioria das infecções no Homem (80 e 20%, respectivamente) e nos animais. Nos últimos anos, no entanto, tem-se observado um aumento da prevalência de infecções por *E. faecium*, principalmente devido a um aumento do número de estirpes com resistência adquirida aos antibióticos. *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus raffinosus* têm sido também identificados a partir de estirpes clínicas, mas em número muito mais reduzido. As infecções mais comumente causadas por enterococci no Homem incluem infecções pós-cirúrgicas, infecções do tracto urinário (também em animais) e do tracto biliar, endocardites, bacteriémia, infecções de feridas e infecções associadas a peritonite e abscessos intra-abdominais (Murray, 1990; Thal, et al., 1995; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; De Leener, Decostere, De Graef, Moyaert & Haesebrouck, 2005; Delgado, Neto, Duarte Correia & Pomba, 2007; EARSS Annual Report 2008; Ogier & Serror, 2008; Ossiprandi, Bottarelli, Cattabiani & Bianchi, 2008; Fisher & Phillips, 2009; Hollenbeck & Rice, 2012; Kwon, Moon, Hwang & Park, 2012; Nilsson, 2012; Kataoka et al. 2013; Tremblay et al., 2013). Dados recentes demonstram que os enterococci são os terceiros agentes nosocomiais patogénicos mais frequentemente isolados, logo a seguir aos *Staphylococcus* coagulase-negativos e aos *Staphylococcus aureus* (Ghosh et al., 2011; Hollenbeck & Rice, 2012; Werner et al., 2013).

A par do aparecimento dos *E. faecalis* e *E. faecium* como agentes patogénicos nosocomiais tem sido observado o aparecimento cada vez mais frequente de estirpes multi-resistentes, em ambas as espécies. Esta capacidade de adquirir resistência a diversos antibióticos, associada à capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, fornece aos enterococci uma vantagem adaptativa que lhes permite sobreviver em ambientes hospitalares (tanto humanos como veterinários), com consequências clínicas ao nível da mortalidade, morbilidade e escolha do antibiótico, e económicas com o aumento dos custos de hospitalização e terapêutica. Para além do seu impacto como agentes patogénicos nosocomiais, as estirpes de enterococci multi-resistentes podem ainda servir como reservatórios de genes de resistência para outras espécies microbianas mais patogénicas, facto que representa um preocupante risco para a saúde pública.

Também o contacto próximo que se verifica entre o Homem e seus animais de estimação (derivado da sua percepção como membros da família), o uso das mesmas classes de antibióticos tanto em medicina como em medicina veterinária e a localização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de resistências em elementos móveis (como plasmídeos e transposões) podem favorecer a transferência de genes de resistência entre a microbiota

humana e animal (Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Guardabassi, Schwarz & Lloyd, 2004; Herrero, Fernández-Garayzábal, Moreno & Domínguez, 2004; De Leener et al., 2005; French, 2005; Lester, Frimodt-Møller, Sørensen, Monnet & Hammerum, 2006; Delgado et al., 2007; Guardabassi, Jensen & Kruse, 2008; Weese, 2008; Jackson et al., 2009; Jackson et al., 2010; Hammerum, 2012; Kwon et al., 2012; Kataoka et al. 2013; Werner et al., 2013).

Ao contrário do que se verifica nos animais de produção, existe uma relativa ausência de orientações sobre a utilização prudente de antimicrobianos na prática clínica de animais de companhia. Estas estão apenas disponíveis em alguns países e limitam-se, normalmente, a indicações genéricas sobre a selecção de antibióticos. Entre os profissionais de saúde existe um alargado consenso relativamente às consequências das falhas de tratamento, mas falta de sensibilização para os possíveis riscos associados à sobre-exposição aos antibióticos, apesar de dados recentes terem vindo a demonstrar que a sua utilização promove a colonização por bactérias multi-resistentes, especialmente quando são utilizados fármacos de largo espectro, e que fenótipos de resistência clinicamente relevantes têm vindo a emergir em bactérias isoladas de animais de companhia, especialmente em cães (Guardabassi et al., 2008).

De forma a tentar minimizar o possível impacto do uso de antibióticos sobre a saúde pública e animal, diversas organizações internacionais (a World Health Organization - WHO, a World Organization for Animal Health - OIE, a Food and Agriculture Organization - FAO e a Comissão Europeia) têm enfatizado a importância da sua utilização racional e prudente, em animais. Estas recomendações têm sido reconhecidas por diversas associações profissionais, tais como: a World Veterinary Association (WVA), a International Federation of Agricultural Producers (IFAP), a World Federation of the Animal Health Industry (COMISA), a Federation of Veterinarians of Europe (FVE), o American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) e a American Veterinary Medical Associations (AVMA), assim como diversas Autoridades Nacionais e Internacionais. Todas estas entidades enfatizam a importância da utilização prudente dos antibióticos para a salvaguarda da sua eficácia clínica e para a prevenção da emergência e disseminação de fenótipos de resistência, tanto em bactérias patogénicas como em bactérias comensais, que possam ser transmitidas entre os animais e o Homem (Guardabassi et al., 2004; Guardabassi et al., 2008).

Os principais fármacos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por enterococci são a ampicilina (e outros β -lactâmicos, nos animais e Humanos) e a vancomicina (em Humanos). Os aminoglicosídeos são normalmente utilizados em combinação com a ampicilina (efeito sinérgico e bactericida), no tratamento de infecções graves. A ocorrência de resistência e/ou multi-resistência põe em causa a eficácia do tratamento e levanta sérios problemas de saúde pública (Landman & Quale, 1997; Guardabassi et al., 2008).

Estes factos, juntamente com a existência de uma reduzida quantidade de dados referentes ao uso de antimicrobianos e à ocorrência de resistências nos animais de companhia (os dados actualmente existentes referem-se maioritariamente às espécies destinadas ao consumo humano, incluindo os cavalos), alertam para a necessidade e para a importância de se realizarem mais estudos que permitam determinar a importância dos animais de companhia como reservatórios de genes de resistência e de se realizarem estudos epidemiológicos frequentes (Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Guardabassi et al., 2004; Herrero et al., 2004; De Leener et al., 2005; Delgado et al. 2007; Lloyd, 2007; Weese, 2008; Jackson et al., 2009; Jackson et al., 2010; Ghosh et al., 2011; de Jong et al., 2013; Kataoka et al., 2013; Tremblay et al., 2013).

Atendendo aos dados bibliográficos recolhidos, considerámos ser pertinente a realização de um estudo que permitisse identificar e caracterizar o perfil de susceptibilidade das estirpes clínicas de *Enterococcus* isoladas no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Portugal, incluindo a detecção de estirpes com elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos (“High-Level Aminoglycoside Resistance” – HLAR).

Numa segunda fase, e uma vez que a presença de estirpes resistentes pode afectar a escolha da terapêutica a implementar, considerámos importante proceder a uma comparação entre o método da difusão em disco e o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) na avaliação da susceptibilidade das estirpes de enterococci à penicilina, à ampicilina, à estreptomicina, à gentamicina e à vancomicina. Esta avaliação teve como objectivo determinar se o método de difusão em disco é uma alternativa segura e confiável na avaliação de rotina da susceptibilidade dos enterococci. Com o mesmo objectivo, procedeu-se ainda à comparação entre duas técnicas de microdiluição para determinação da CIM (microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth e um sistema comercial - DADE MicroScan[®] para gram positivos).

Finalmente, e numa fase posterior, caracterizaram-se os mecanismos moleculares de resistência à gentamicina e procedeu-se à identificação da presença do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) e dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id*.

2 Enterococcus – Resistências Naturais e Adquiridas a Antibióticos

Ao longo da História, as doenças infecciosas têm representado uma importante ameaça à saúde tanto do Homem como dos animais, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Estas taxas (morbidade e mortalidade) foram significativamente reduzidas com a introdução dos antimicrobianos na prática clínica. No entanto, a exposição aos antibióticos resulta na selecção de bactérias resistentes e consequentemente numa diminuição progressiva da sua eficácia na terapêutica de diversas infecções bacterianas. O aumento da prevalência e a dissiminação da resistência aos antibióticos, associada à dificuldade em desenvolver novos fármacos tem vindo a resultar num importante problema de saúde pública a nível mundial (Guardabassi et al., 2008).

A resistência aos antibióticos nos enterococci pode ser de dois tipos: intrínseca ou adquirida. Os enterococci apresentam resistência intrínseca às cefalosporinas, às penicilinas resistentes às penicilinases, às polimixinas, aos aminoglicosídeos em baixas concentrações, à clindamicina, às fluoroquinolonas, à associação trimetoprim/sulfametoxazol (*in vivo*), aos monobactams, às lincosamidas (lincomicina, clindamicina) e, no caso dos *E. faecalis*, às estreptograminas (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Pai & Kim, 1998; Shepard & Gilmore, 2002; Singh, Weinstock & Murray, 2002; Werner, Klare & Witte, 2002; Klare et al., 2003; Mutnick, Biedenbach & Jones, 2003; Petinaki, Kontos & Maniatis, 2006; Amyes, 2007; Delgado et al. 2007; EARSS Annual Report 2008; Hammerum, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Kataoka et al. 2013). *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus flavescens* apresentam ainda resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina (Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Klare et al., 2003). Observa-se ainda uma tolerância (ausência de acção bactericida, mas com presença de inibição do crescimento) a todos os fármacos que actuam por inibição da síntese da parede bacteriana, incluindo os β -lactâmicos e a vancomicina. Desta forma, mesmo em concentrações elevadas, a penicilina apresenta nos enterococci uma acção bacteriostática e não bactericida (Pai & Kim, 1998; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

Adicionalmente, os enterococci apresentam ainda a capacidade de adquirir resistência a outros antibióticos através da transferência de plasmídeos e/ou transposões, trocas cromossómicas, recombinação/conjugação ou mutações. A resistência adquirida ocorre quando estão presentes dois pré-requisitos: a) potencial genético por parte do microorganismo (aquisição de genes de resistência, acumulação de mutações) e b) pressão selectiva (devido ao uso dos antibióticos). A resistência a um determinado antibiótico pode inclusivamente ser seleccionada pelo uso de outro antibiótico. Exemplos de resistência adquirida incluem a resistência às penicilinas por proteínas de ligação às penicilinas de baixa afinidade (Low-affinity PBPs) ou produção de β -lactamases, resistência ao cloranfenicol, aos macrólidos, às tetraciclinas, às fluoroquinolonas, resistência de elevado nível aos aminoglicosídeos (High-Level Aminoglycoside Resistance – HLAR), e resistência aos

glicopéptidos (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Guardabassi et al., 2008; Hammerum, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

Os enterococci possuem uma grande variedade de mecanismos, através dos quais adquirem resistência à maioria das classes de antibióticos. Na tabela 1 e 2 estão resumidos os mecanismos de resistência dos enterococci às diferentes classes de antibióticos.

Tabela 1. Resistência intrínseca a antibióticos nos enterococci

Resistência intrínseca			
Antibióticos	Mecanismo de resistência	Gene	Fenótipo de resistência
β-lactâmicos	PBPs de baixa afinidade (PBP4 e PBP5); tolerância	Cromossômico	Resistência de baixo nível aos β-lactâmicos
Cefalosporinas	Diminuição da afinidade para as PBPs 4, 5, 6	Cromossômico	Resistência a todas as cefalosporinas
Aminoglicosídeos	Baixa permeabilidade; redução do “uptake”; Enzima modificadora dos aminoglicosídeos e metiltransferase modificadora do ribossoma (<i>E. faecium</i>)	Cromossômico	Baixo nível de resistência
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	Capacidade de utilizar folatos exógenos	Cromossômico	Resistência <i>in vivo</i>
Fluoroquinolonas	Baixa permeabilidade; redução do “uptake”	Cromossômico	
Glicopéptidos	Produção de precursores modificados com baixa afinidade para a vancomicina	Cromossômico (gene <i>vanC</i>)	Baixo nível de resistência à vancomicina – <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i> e <i>E. gallinarum</i>
Clindamicina e Estreptograminas	Bomba efluxo	Cromossômico (gene <i>lsa</i> - <i>E. faecalis</i>)	Resistência a lincosamidas, estreptograminas A e B, associação Quinupristina/Dalfopristina
		Cromossômico (gene <i>msrC</i> - <i>E. faecium</i>)	Baixo nível de resistência às estreptograminas B

Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Klare et al., 2003; Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Singh et al., 2002.

Tabela 2. Resistência adquirida a antibióticos nos enterococci

Resistência adquirida			
Antibióticos	Mecanismo de resistência	Gene	Fenótipo de resistência
Penicilinas	PBPs alteradas; sobreprodução de PBPs	Cromossomal (gene <i>pbp5</i>)	Elevado nível de resistência a todos os β -lactâmicos
	Produção de β -lactamases	Transposição/plasmídeo Tn552, Tn5385 (gene <i>bla</i>)	Elevado nível de resistência a todas as penicilinas
Aminoglicosídeos	Enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (AMEs)	Transposição/plasmídeo	Elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR)
Glicopéptidos	Inibição síntese parede celular - diminuição afinidade para glicopéptidos	Transposição/plasmídeo Genes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>vanD</i> , <i>vanE</i> e <i>vanG</i>	Resistência aos glicopéptidos (variável conforme o fenótipo)
Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do tipo B	Metilação do 23S rRNA bacteriano	Gene <i>erm(A)</i> ; <i>erm(B)</i> -Transposões Tn554; Tn917 e Tn1545	Resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas
	Acetiltransferases; hidrolase; bombas de efluxo	Genes <i>mef(A)</i> , <i>mef(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>vat(E)</i> , <i>vat(D)</i> , <i>vat(H)</i> <i>vgb(A)</i>	
Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferase	Plasmídeo – genes <i>cat</i>	Resistência ao cloranfenicol
	Mecanismos de efluxo		
Tetraciclinas	Proteção ribossomal (redução da afinidade)	Genes <i>tetM</i> ; <i>tetO</i> , <i>tetS</i>	Resistência às tetraciclinas e à minociclina
	Mecanismos de efluxo	Genes <i>tetK</i> ; <i>tetL</i>	Resistência às tetraciclinas
	Mecanismo desconhecido	Gene <i>tetU</i>	Resistência às tetraciclinas e à minociclina

Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Singh et al., 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012.

Tabela 2 (continuação). Resistência adquirida a Antibióticos nos enterococci

Resistência adquirida			
Antibióticos	Mecanismo de resistência	Gene	Fenótipo de resistência
Fluoroquinolonas	Mutação nos genes girase e topoisomerase IV	Genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	Resistência de elevado nível às fluoroquinolonas (mutação <i>gyrA</i> e <i>parC</i>); Resistência de nível moderado às fluoroquinolonas (mutação <i>parC</i>)
Oxazolidonas	Mutação no 23S rRNA do nucleótido 2576	Genes G2576T, G2505A e L4 (F101L)	Resistência à linezolida
Evernimomicinas (daptomicina)	metiltransferase: metilação do G2470 no 23S rRNA	Gene <i>emtA</i>	Resistência à evernimomicina e à avilamicina
Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Singh et al., 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012.			

2.1 Resistência Intrínseca

a) β -Lactâmicos

Os enterococci apresentam resistência intrínseca de baixo nível aos antibióticos β -lactâmicos devido à produção de PBPs de baixa afinidade (PBP5 em *E. faecium* e PBP4 em *E. faecalis*). Assim, as CIM de *E. faecalis* para a penicilina são dez a 100 vezes superiores às de streptococci. *E. faecium*, por sua vez são quatro a 16 vezes menos susceptíveis à penicilina que *E. faecalis* (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

Adicionalmente observa-se, neste género, uma tolerância (ausência de acção bactericida, mas com presença de inibição do crescimento) a todos os fármacos que actuam por inibição da síntese da parede bacteriana, incluindo os β -lactâmicos sendo que, mesmo em concentrações elevadas, a penicilina apresenta em enterococci uma acção bacteriostática e não bactericida. Este fenómeno foi inicialmente descrito por Jawetz e Sonne (1966) e em *E. faecalis* tem sido atribuído à acção da enzima superóxido dismutase. A tolerância pode também ser induzida pela exposição intermitente à penicilina. Desta forma, estirpes de enterococci podem aparentar ser susceptíveis *in vitro*, mas desenvolvem tolerância após expostas ao fármaco antimicrobiano (Pai & Kim, 1998; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

De referir ainda que, nenhuma das cefalosporinas consegue inibir os enterococci a níveis que permitam o seu uso clínico (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

b) Lincosamidas e Estreptograminas

A resistência intrínseca de *E. faecalis* às estreptograminas A e à associação quinupristina/dalfopristina deve-se à acção de bombas de efluxo codificadas pelo gene cromossomal *lsa*. Adicionalmente este gene confere ainda resistência às lincosamidas (Singh et al., 2002; Werner et al., 2002; Petinaki et al., 2006; Hollenbeck & Rice, 2012).

A inactivação do gene *lsa* resulta na susceptibilidade à clindamicina, à dalfopristina e à associação quinupristina/dalfopristina. Pelo contrário a complementação com um plasmídeo recombinante portador de um gene *lsa* restaura esta resistência (Petinaki et al., 2006). Apesar de a maioria dos *E. faecalis* apresentarem resistência à associação quinupristina/dalfopristina, tem sido descrita a nível mundial, a ocorrência de estirpes susceptíveis à associação, assim como à clindamicina e à dalfopristina. No entanto o mecanismo envolvido é ainda desconhecido (Petinaki et al., 2006).

Os *E. faecium* também apresentam um sistema de bomba de efluxo, este codificado pelo gene *msrC*, que confere resistência de baixo nível às estreptograminas B (Werner et al., 2002; Hollenbeck & Rice, 2012).

c) Aminoglicosídeos

A resistência de baixo nível aos aminoglicosídeos é também uma característica do género enterococci, devido à capacidade que apresentam de limitar a entrada dos aminoglicosídeos na célula bacteriana. Esta limitação tem origem no facto de a entrada dos aminoglicosídeos nas células ser dependente de energia. Uma vez que os enterococci não possuem enzimas citocromo são por isso incapazes de produzir metabolicamente a energia necessária para a entrada dos aminoglicosídeos nas células, levando assim à ocorrência de resistência de baixo nível. Um outro mecanismo, observado apenas em *E. faecium*, consiste na inactivação enzimática do aminoglicosídeo por uma enzima codificada no cromossoma (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Fisher & Phillips, 2009; Galimand et al., 2011; Hollenbeck & Rice, 2012).

Esta resistência de baixo nível pode ser ultrapassada na terapêutica de infecções por enterococci com a associação de um fármaco que actue por inibição da síntese da parede celular bacteriana (β -lactâmicos e glicopéptidos) com um aminoglicosídeo, o que resulta num efeito sinérgico bactericida: o β -lactâmico (por exemplo a ampicilina) inibe a formação da parede celular, permitindo a entrada do aminoglicosídeo (Pai & Kim, 1998; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

Os *E. faecium* possuem ainda enzimas codificadas por genes cromossomais (uma enzima modificadora dos aminoglicosídeos e uma metiltransferase modificadora do ribossoma) que são responsáveis pelo aumento das CIM dos aminoglicosídeos, impedindo assim que o efeito sinérgico ocorra (Hollenbeck & Rice, 2012). A aminoglicosídeo 6' acetiltransferase (AAC(6')-II) confere resistência de baixo nível à tobramicina e canamicina. A metiltransferase de *E. faecium* (EfmM) confere resistência de baixo nível à dibecacina, à tobramicina e à canamicina (Galimand et al., 2011; Hollenbeck & Rice, 2012).

Até à data não se encontra descrita a ocorrência de resistência intrínseca de elevado nível à gentamicina ou à estreptomicina, motivo pelo qual continuam a ser os aminoglicosídeos os fármacos de eleição na terapêutica de infecções por enterococci em associação com um inibidor da síntese da parede bacteriana (Hollenbeck & Rice, 2012).

d) Trimetoprim/sulfametoxazol

A determinação da actividade *in vivo* e *in vitro* do trimetoprim/sulfametoxazol sobre os enterococci apresenta resultados controversos. Estas discrepâncias devem-se ao facto de os enterococci apresentarem a capacidade de utilizar folatos exógenos apresentando assim resistência *in vivo* à associação trimetoprim/sulfametoxazol, apesar de os testes de sensibilidade realizados em meios desprovidos de folatos sugerirem susceptibilidade (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Hollenbeck & Rice, 2012).

e) Glicopéptidos

E. gallinarum, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* apresentam resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina. Estas estirpes apresentam um fenótipo designado VanC, sendo que raramente são isoladas a partir de amostras clínicas (Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Klare et al., 2003; Fisher & Phillips, 2009; Hollenbeck & Rice, 2012; Nilsson, 2012; Kataoka et al. 2013).

f) Fluoroquinolonas

A resistência intrínseca de baixo nível às fluoroquinolonas deve-se à baixa permeabilidade da membrana citoplasmática e a uma redução da entrada das moléculas para o interior da célula microbiana. Este tipo de resistência é codificado por um gene cromossomal (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Klare et al., 2003; Petinaki et al., 2006).

Apesar de o mecanismo de resistência não estar completamente esclarecido, Arsène & Leclercq (2007) identificaram um gene semelhante ao gene *qnr* (*qnr* *E. faecalis*) e descreveram o seu papel na resistência intrínseca de enterococci às fluoroquinolonas.

2.2 Resistência Adquirida

a) β -Lactâmicos

Como já foi referido anteriormente, os enterococci apresentam resistência intrínseca de baixo nível aos antibióticos β -lactâmicos devido à produção de PBPs de baixa afinidade. No entanto, os enterococci têm vindo a adquirir outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, tais como a sobreprodução de PBPs, a produção de PBPs alteradas (especialmente a PBP5) com menor afinidade para as benzilpenicilinas e a produção de β -lactamases (codificada pelo gene *bla*). A aquisição destes mecanismos de resistência confere às estirpes uma resistência de elevado nível aos antibióticos β -lactâmicos (Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; EARSS Annual Report 2008; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

Embora tenham já sido descritas, as estirpes de enterococci produtoras de β -lactamases ainda são raras. Na maioria dos casos a produção de β -lactamases está codificada em elementos móveis, tais como plasmídeos e transposões, e são responsáveis pela hidrólise e consecutiva resistência à penicilina, à ampicilina e à piperacilina (e outras ureidopenicilinas). No entanto, não causam resistência às penicilinas semi-sintéticas, às cefalosporinas e ao imepeneme. Vários estudos têm demonstrado que estas β -lactamases são homólogas às produzidas por *Staphylococcus aureus*, embora a sua expressão apresente algumas diferenças, tais como o facto de a sua produção ser constitutiva, de baixo nível e dependente do inóculo (Murray, 1990; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; EARSS Annual Report 2008; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

b) Aminoglicosídeos - Elevado Nível de Resistência (High Level Aminoglycoside Resistance - HLAR)

Os enterococci apresentam resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos, a qual é ultrapassada pelo efeito sinérgico que resulta da associação de um aminoglicosídeo com um fármaco inibidor da síntese da parede celular bacteriana. Os enterococci apresentam ainda a capacidade de adquirir genes que lhes conferem resistência de elevado nível a esta classe de antibióticos (Murray, 1990; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; EARSS Annual Report 2008; Hollenbeck & Rice, 2012).

Os mecanismos de resistência implicados na aquisição desta resistência serão explicados de um modo pormenorizado no capítulo 3.

c) Glicopéptidos

Os glicopéptidos inibem a síntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias gram-positivas através da ligação ao pentapéptido do precursor mureína. Para esta ligação é essencial o terminal D-alanil-D-alanina (formação de ligações de hidrogénio). Após esta

ligação os glicopéptidos inibem a subsequente reacção de transglicosilação, através do impedimento estérico (Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Amyes, 2007; Hollenbeck & Rice, 2012; Nilsson, 2012).

Até à data são conhecidos 7 genótipos de resistência aos aminoglicosídeos: dois intrínsecos e cinco adquiridos. Os diferentes genótipos baseiam-se no mesmo princípio: o terminal D-alanil-D-alanina do pentapéptido do precursor mureína é substituído por um ácido α -D-hidroilico (D-lactato ou D-serina) e esta alteração, com formação de um depsipéptido leva a uma diminuição da afinidade para os glicopéptidos (Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Amyes, 2007; Arias & Murray, 2012; Nilsson, 2012).

Dos sete tipos de resistência aos glicopéptidos conhecidos, o que apresenta maior relevância clínica é o fenótipo VanA que confere resistência a elevados níveis de vancomicina, teicoplanina e avoparcina. Esta resistência é passível de ser induzida pelos três antibióticos (resistência cruzada). O fenótipo VanB é o segundo mais importante e caracteriza-se por resistência (induzida) de baixos a elevados níveis de vancomicina, mantendo-se no entanto sensível à teicoplanina. No entanto, a expressão constitutiva (seleccionada pela exposição à teicoplanina) confere resistência a ambos os antibióticos. Os restantes tipos são de menor importância clínica e são caracterizados por resistência à vancomicina (baixa a moderada) e susceptibilidade (maior ou menor) à teicoplanina. O fenótipo VanD é caracterizado por resistência à vancomicina (moderada) e à teicoplanina (baixa a moderada). O fenótipo VanC, típico das espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*, é responsável por resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina. Os fenótipos VanE e vanG são também caracterizados por resistência de baixo nível à vancomicina (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Amyes, 2007; Hollenbeck & Rice, 2012; Nilsson, 2012; Kataoka et al., 2013).

Um novo mecanismo responsável pela ocorrência de resistência de elevado nível aos glicopéptidos e β -lactâmicos, mediada por uma L,D-transpeptidase insensível aos β -lactâmicos (Ldt_{tm}) presente em *E. faecium*, foi descrito por Cremniter, Mainardi, Josseaume, Quincampoix, Dubost, Hugonnet, Marie, Gutmann, Rice & Arthur (2006).

d) Cloranfenicol

Estão descritos dois mecanismos de resistência ao cloranfenicol em estirpes de *Enterococcus*. O primeiro consiste numa cloranfenicol acetiltransferase - gene *cat* codificado num plasmídeo de origem estreptocócica ou estafilocócica (reflecte a ocorrência de transferência horizontal de genes entre diferentes espécies de bactérias), responsável pela inibição da biossíntese de proteínas através da ligação à subunidade 50S do ribossoma e da inibição da peptidiltransferase. O segundo consiste num mecanismo de efluxo (Murray, 1990; Pai & Kim, 1998; Klare et al., 2003; Werner et al., 2013).

e) Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do tipo B (antibióticos MLS_B)

Os plasmídeos e transposições que codificam genes de resistência à eritromicina, às lincosamidas e às estreptograminas são também comumente encontrados nos enterococci. A resistência a estas classes de antibióticos é mediada por diversos mecanismos: a metilação de um resíduo de adenosina no 23S rRNA da subunidade ribossomal 50S, a inactivação dos antibióticos através da acção de acetiltransferases ou de uma hidrólase ou por um mecanismo de bombas de efluxo (Pai & Kim, 1998; Leclercq, 2002; Singh et al., 2002; Werner et al., 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Werner et al., 2013).

O mecanismo de resistência mais frequente e melhor compreendido, é a metilação ribossomal que dá origem aos fenótipos MLS_a e MLS_b codificados pelos genes *erm(A)* e *erm(B)*, respectivamente. Destes, o mais comum é o *ermB* que é transportado pelos transposições Tn917 e Tn1545, e a sua expressão pode ser constitutiva ou induzida, dando origem a diversos fenótipos de resistência (Murray, 1990; Leclercq, 2002; Werner et al., 2002; Klare et al., 2003; Hollenbeck & Rice, 2012).

Até à data estão descritos 12 genes codificadores de acetiltransferases, entre os quais: *vatD*, *vatE*, *vatH* e *vgbA*, responsáveis pela resistência dos enterococci às estreptograminas. Com excepção do *vatE* (que tem sido isolado em *E. faecium* e *E. faecalis*), todos estes genes têm sido isolados exclusivamente em *E. faecium*. A lincosamida nucleotidiltransferase, codificada pelo gene *lnu(B)*, é detectada apenas nos *E. faecium* e confere resistência à lincomicina e um aumento das CIM da clindamicina com anulação da sua actividade bactericida (Leclercq, 2002; Klare et al., 2003; Hollenbeck & Rice, 2012).

O mecanismo de bombas de efluxo é mediado pelos genes *vgaD* (em *E. faecium*, confere resistência às estreptograminas A) e *mef(A)* (confere resistência aos macrólidos) (Murray, 1990; Singh et al., 2002; Werner et al., 2002; Leclercq, 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Werner et al., 2013).

f) Tetraciclinas

A resistência às tetraciclinas é codificada por genes *tet*, que actuam por meio de dois mecanismos: os mecanismos de efluxo (genes *tet(L)* e *tet(K)* - medeiam o efluxo das tetraciclinas das células) e a protecção ribossomal ou redução de afinidade (genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)*). O gene *tet(M)* está frequentemente associado aos transposições Tn913/1545 ou a transposições conjugativos. Os restantes genes encontram-se localizados no cromossoma (*tet(L)*) ou em plasmídeos conjugativos (*tet(L)*, *tet(O)* e *tet(S)*) (Murray, 1990; Werner et al., 2013).

De realçar o facto de os genes de resistência inseridos no plasmídeo pAMα1 (*tet(L)*) duplicarem ou amplificarem sempre que o hospedeiro se encontra num ambiente com concentrações sub-inibitórias de tetraciclina. Tal resulta num aumento do tamanho do plasmídeo e em CIMs mais elevadas (Murray, 1990).

Em *E. faecium* foi ainda identificado o gene *tet(U)* (Klare et al., 2003).

g) Fluoroquinolonas

A resistência às fluoroquinolonas deve-se a mutações nos genes *gyrA* (girase) e *parC* (topoisomerase IV). A maioria dos enterococci apresenta apenas susceptibilidade intermédia às fluoroquinolonas, sendo que muitas estirpes são mesmo resistentes (Pai & Kim, 1998; Klare et al., 2003).

h) Oxazolidonas

A emergência da resistência à linezolida tem ocorrido lentamente e apenas associada à exposição prolongada. Diversas mutações no 23S rRNA têm sido identificadas, das quais a mais comum é a G2576T. Em 2011 foi identificado pela primeira vez o gene *crf* (que codifica uma rRNA metiltransferase) numa estirpe de *E. faecalis* isolada numa exploração de bovinos. Até à data a resistência à linezolida em enterococci continua a ser um fenómeno muito raro (Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

3 Elevado Nível de Resistência aos Aminoglicosídeos (High Level Aminoglicoside Resistance - HLAR)

Conforme referido anteriormente os enterococci apresentam uma resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos (baixa permeabilidade), que é ultrapassada pelo efeito sinérgico que resulta da associação de um aminoglicosídeo com um fármaco inibidor da síntese da parede celular bacteriana. Adicionalmente este género apresenta ainda a capacidade de adquirir genes (enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos – responsáveis pela conjugação do antibiótico com um de três grupos: grupo acetil, grupo adenil ou grupo fosforil, tornando-o inactivo) que lhes conferem resistência de elevado nível a esta classe de antibióticos, tendo sido identificados nove genes que codificam enzimas que têm como alvo oito aminoglicosídeos diferentes (Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003).

Estão descritos dois mecanismos responsáveis pela ocorrência de resistência de elevado nível à estreptomicina. Um dos mecanismos é uma mutação isolada numa proteína da subunidade ribossomal 30S. Esta mutação elimina a capacidade da estreptomicina se ligar à subunidade ribossomal e exercer o seu efeito inibidor da síntese de proteínas. O segundo mecanismo consiste na produção de uma de duas enzimas específicas modificadoras dos aminoglicosídeos (neste caso, estreptomicina adeniltransferases) – ANT(6')-Ia ou ANT(3'')-Ia. Estas estirpes permanecem sensíveis à gentamicina (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012).

A ocorrência de resistência de elevado nível à canamicina, na ausência de resistência de elevado nível à gentamicina, deve-se à produção de uma de duas enzimas: uma enzima, a 3'-fosfotransferase (*aph(3')-IIIa*), que tem também actividade sobre a amicacina (eliminando desta forma efeito sinérgico da associação amicacina/penicilina) ou uma enzima 4'-nucleotidiltransferase (*ant(4')-Ia*), com actividade sobre a amicacina e a tobramicina (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Pai & Kim, 1998; Centinkaya et al., 2000; Klare et al., 2003; Hollenbeck & Rice, 2012).

A resistência a elevados níveis de gentamicina resulta, na maioria dos casos, da presença da enzima bifuncional 6'-aminoglicosido acetiltransferase 2''aminoglicosido fosfotransferase [*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*] que confere resistência de elevado nível (CIM \geq 500 μ g/ml a CIM \geq 2000 μ g/ml) a todos os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, netilmicina, amicacina e canamicina), com excepção da estreptomicina. Adicionalmente, a resistência a elevados níveis de gentamicina pode ainda dever-se à presença de um de três genes modificadores da gentamicina: *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*. O gene *aph(2'')-Ib* está associado a resistência de elevado nível (CIM \geq 500 μ g/ml) à gentamicina e outros aminoglicosídeos (tobramicina, canamicina e netilmicina) em *E. faecium*. Por outro lado, o gene *aph(2'')-Ic* está associado a resistência de nível médio (CIM de 256 a 512 μ g/ml) à gentamicina, à tobramicina

e à canamicina (mas não à amicacina ou à netilmicina). Finalmente, o gene *aph(2'')-Id* confere resistência de elevado nível à gentamicina, à tobramicina, à canamicina e à netilmicina, mas não à amicacina (Murray, 1990; Simjee & Gill, 1997; Chow, Donabedian, Clewell, Sham & Zervos, 1998; Pai & Kim, 1998; Tsai, Zervos, Clewell, Donabedian, Sahm & Chow, 1998; Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Donabedian, et al., 2003; Lopes, Ribeiro, Martins, Tenreiro & Crespo, 2003; Klare et al., 2003; Vakulenko, Donabedian, Voskresenskiy, Zervos, Lerner & Chow, 2003; EARSS Annual Report 2008; Arias & Murray, 2012; Hollenbeck & Rice, 2012; Werner et al., 2013).

No passado considerou-se que a presença de resistência de elevado nível à gentamicina (devido à presença da enzima bifuncional) eliminava o uso terapêutico de todos os aminoglicosídeos, com excepção da estreptomicina. No entanto, a descoberta dos genes *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id* (que codificam resistência à gentamicina, mas não a alguns dos outros aminoglicosídeos) demonstrou que a resistência de elevado nível à gentamicina não exclui, na totalidade dos casos, o uso terapêutico de outros aminoglicosídeos em associação com um β -lactâmico (Pai & Kim, 1998; Vakulenko et al., 2003; Hollenbeck & Rice, 2012).

A disseminação da resistência de elevado nível à gentamicina deve-se principalmente ao facto dos genes responsáveis pela mesma poderem ser transferidos via plasmídeos e transposões, podendo desta forma disseminar-se entre os enterococci (Simjee & Gill, 1997; Tsai et al., 1998; Donabedian et al., 2003; Lopes et al., 2003; Vakulenko et al., 2003; Hollenbeck & Rice, 2012).

Após avaliação dos dados bibliográficos recolhidos, considerámos que seria de interesse a realização de um estudo que tivesse como objectivo identificar e caracterizar o perfil de susceptibilidade das estirpes clínicas de *Enterococcus* isoladas, detectar a presença de estirpes HLAR e fazer a caracterização dos mecanismos moleculares de resistência à gentamicina.

Considerámos também relevante fazer uma comparação entre o método de difusão em disco e o método de microdiluição para determinação da CIM, na avaliação da susceptibilidade das estirpes de enterococci.

Relativamente ao método de microdiluição para determinação da CIM, procedemos ainda à comparação entre duas técnicas: microdiluição em meio Müelller-Hinton-Broth e o sistema comercial DADE MicroScan[®] para gram positivos.

4 Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado em dois períodos temporais distintos. Numa primeira fase foram estudadas 55 estirpes clínicas e os resultados obtidos foram apresentados sob a forma de artigo, com o título “Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats” (anexo 3) e três comunicações orais: “Detection and clinical implication of high-level aminoglycoside resistance among clinical enterococci strains isolated from pets” apresentada no 10th International Congress of European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (10th EAVPT) - 17 a 22 de Setembro realizado em Turin, Itália (anexo 4); “Antimicrobial resistance of uropathogenic enterococci isolated from pets in Portugal”, apresentada no 17th European College of Veterinary Medicine – Companion Animals (ECVIM-CA) Congress and 9 th European Society of Veterinary Clinical Pathology Congress (ESVCP) - 13 a 15 de Setembro realizado em Budapeste, Hungria (anexo 5) e “Antimicrobial Resistance and Detection of High-level Aminoglycoside Resistance Among Enterococci Isolated From Pets in Portugal” apresentada no 19th European College of Veterinary Medicine – Companion Animals (ECVIM-CA) Congress - 08 a 10 de Setembro realizado no Porto, Portugal (anexo 6).

Numa segunda fase (aproximadamente um ano e meio depois) foram analisadas mais 12 estirpes e realizada a caracterização genotípica.

4.1 Estirpes de Enterococci provenientes de infecções em animais de companhia

Neste estudo foram incluídas 67 estirpes clínicas de enterococci, isoladas entre 1998 e 2008 no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Portugal.

As estirpes foram previamente conservadas à temperatura de -20°C, após repicagem de colónias isoladas, em tubo de congelação contendo aproximadamente 2ml de meio glicerol (caldo triptonsoja - TSB - Trypticase Soy Broth com 20% v/v de glicerol).

Após descongelação dos tubos procedeu-se à repicagem, efectuando uma sementeira por estria, das estirpes seleccionadas em placas de agar sangue (Columbia agar + 5% de sangue de ovelha, bioMérieux®, Portugal), recorrendo a uma ansa descartável de 10µl, seguida de incubação a temperatura de 37 ± 1°C durante 24h. Uma colónia isolada foi posteriormente sujeita a confirmação da identificação, ao nível da espécie, com recurso ao sistema “BBL Cristal Gram-Positive ID System ®” (Becton, Dickinson and Company Sparks, Meyland, França), de acordo com as instruções de utilização do fabricante e a metodologia utilizada no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte.

Posteriormente e de acordo com a metodologia atrás descrita, procedeu-se à conservação em novos meios glicerol, de modo a garantir que todo o estudo seria realizado com as estirpes isoladas, e que as mesmas se encontravam livres de qualquer tipo de contaminação.

4.2 Determinação da susceptibilidade aos antibióticos

O perfil de susceptibilidade das estirpes foi avaliado através de dois métodos: difusão em disco e ensaios de microdiluição, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A estirpe de referência utilizada como controlo foi o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

4.2.1. Difusão em disco

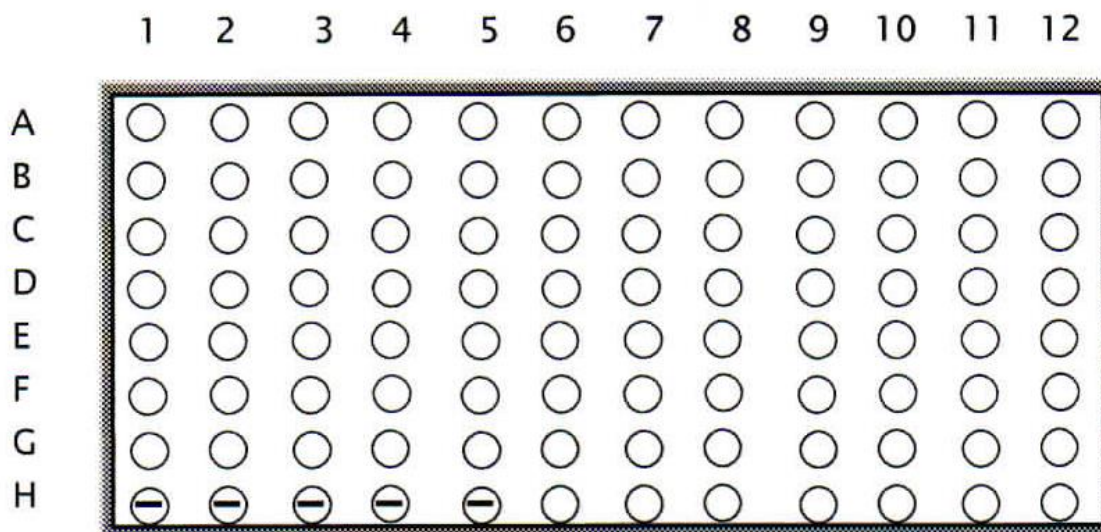
O método de difusão em disco foi realizado de acordo com os procedimentos padrão preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) na norma VET01-A4 (CLSI, 2013). Assim, inocularam-se, com recurso a zaragatoa, placas de Agar Mueller-Hinton (bioMérieux®, Portugal), tendo como inóculo uma suspensão de colónias com concentração equivalente a 0,5 na escala de McFarland. As placas foram incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h. Os discos utilizados foram os seguintes: penicilina G (P) 10U.I., ampicilina (AMP) 10µg, gentamicina (CN) 10µg, gentamicina (CN) 120µg, estreptomicina (STR) 10µg, estreptomicina (STR) 300µg e vancomicina (VA) 30µg (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Na avaliação dos resultados obtidos foram utilizados os critérios clínicos do CLSI na norma VET01-S2 (CLSI, 2013).

4.2.2. Ensaio de microdiluição, para determinação da CIM

Os ensaios de microdiluição, para a determinação da CIM, foram realizados com recurso a duas técnicas: microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth, de acordo com os procedimentos padrão preconizados pelo CLSI na norma VET01-A4 (CLSI, 2013) e DADE MicroScan® para gram positivos (Dade Behring, Lisboa, Portugal).

A técnica de microdiluição em meio de Müller-Hinton-Broth foi realizada em placas de microdiluição estéreis de 96 poços (figura 1). Por cada placa foram testadas sete estirpes, sendo que uma correspondeu sempre à estirpe padrão - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Figura 1. Esquema de placa de microdiluição



Concentrações: poço 1 - 4098µg/ml; poço 2 - 2049µg/ml; poço 3 - 1024µg/ml; poço 4 - 512µg/ml; poço 5 - 256µg/ml; poço 6 - 128µg/ml; poço 7 - 64µg/ml; poço 8 - 32µg/ml; poço 9 - 16µg/ml; poço 10 - 8µg/ml; poço 11 - 4µg/ml e poço 12 - 2µg/ml.

Em cada poço da placa de microdiluição distribuíram-se 100µl de meio Müller-Hinton-Broth (Oxoid®, Reino Unido). De seguida distribuíram-se 100µl de antibiótico (CN 4098µg/ml) em cada poço da coluna 1, excepto no poço da linha H. Após mistura com micropipeta multicanal, fizeram-se diluições seriadas de 1:2 da primeira à décima segunda coluna (excepto na linha H), retirando-se 100µl do poço inicial para o poço seguinte, tendo o cuidado de eliminar os 100µl retirados do último poço (figura 1).

Posteriormente procedeu-se à preparação do inóculo (0,5 na escala de McFarland) fazendo a suspensão de uma colónia isolada de cada uma das sete estirpes a testar em 25ml de uma solução Tween a 0,02% (Sigma®, Portugal). Em cada poço foram depois colocados 10µl de inóculo, uma estirpe por linha (com excepção da linha H). Na linha A foi colocada a estirpe padrão. As primeiras cinco colunas da linha H foram utilizadas como controlos negativos (sem antibiótico, nem inóculo), e as sete colunas seguintes foram utilizadas como controlos positivos (sem antibiótico, mas com inóculo), tendo sido inoculadas com 10µl da suspensão do inóculo no respectivo poço de controlo (uma estirpe por poço) (figura 1).

Finalmente, de cada poço de controlo positivo foi retirado, com a ajuda de uma ansa pré-calibrada, 1µl que foi posteriormente semeado numa placa de Agar-Sangue (Columbia agar + 5% de sangue de ovelha, BioMérieux®, Portugal), de forma a poder confirmar se a contagem obtida após incubação se encontrava entre dez e 100 unidades formadoras de colónia (UFC). As placas foram incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 16 a 18 horas, e posteriormente avaliadas segundo os critérios clínicos CLSI na norma VET01-S2 (CLSI, 2013). A leitura das placas de microdiluição foi feita visualmente. O valor da CIM foi

considerado como a concentração correspondente ao primeiro poço que apresentou inibição do crescimento bacteriano (ausência de turvação).

De modo a validar os resultados obtidos utilizaram-se os seguintes critérios: a) placas de controlo positivo com cultura pura e contagem de UFC entre os limites estipulados (dez e 100 UFC) e b) valores de CIM da estirpe de referência de acordo com os valores preconizados pela CLSI na norma VET01-S2 (CLSI, 2013).

Os ensaios de microdiluição, com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos (Dade Behring, Lisboa, Portugal), foram realizados de acordo com as instruções de utilização do fabricante.

Para a preparação do inóculo foi utilizado o sistema Prompt (Dade Behring, Lisboa, Portugal). Assim, segurando a ponta da vara perpendicularmente à superfície da gelose, tocou-se em três colónias isoladas de tamanho igual e/ou maior que a ponta. Seguidamente fez-se deslizar o anel, retirando-o do eixo da vara e colocou-se a mesma dentro do frasco, selando-o, e agitou-se vigorosamente (oito a dez vezes). Posteriormente verteu-se a suspensão num tabuleiro de sementeira. A rehidratação e inoculação dos painéis foram realizadas utilizando o sistema RENOK® com os inoculadores-D, que funcionam como uma pipeta multicanal que cobre todos os poços da placa e inocula, numa única aplicação, a quantidade pré-determinada de inóculo. A técnica foi repetida para cada estirpe. De cada poço de controlo positivo (G) foi retirado, com a ajuda de uma ansa pré-calibrada, 1µl que foi posteriormente semeado numa placa de Agar-Sangue. Os painéis foram empilhados em grupos de três a cinco, com um tabuleiro de cobertura no topo de cada grupo, e incubados à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 16 a 24 horas. A avaliação da vancomicina foi realizada após 24 horas de incubação. A avaliação de despiste sinérgico com gentamicina e estreptomicina (detecção de elevado nível de resistência) foi realizada após 24 e 24 a 48 horas de incubação, respectivamente. A leitura dos painéis foi realizada de forma semelhante à utilizada na técnica de microdiluição em meio de Mueller-Hinton-Broth, e os resultados registados em folhas de leitura adequadas (anexo 2) e avaliados, segundo os critérios clínicos CLSI na norma VET01-S2 (CLSI, 2013) e os critérios interpretativos fornecidos pelo fabricante, nas instruções de utilização [baseados nos critérios clínicos NCCLS M100-S14, no relatório de 2003 do Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) e nas Recomendações do Grupo MENSURA (Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) para la selección de antimicrobianos en la sensibilidad y critérios para la interpretación de antibiograma 2001]. O valor da CIM foi considerado como a concentração correspondente ao primeiro poço que apresentou inibição do crescimento bacteriano (ausência de turvação).

Os resultados obtidos com os ensaios de microdiluição, para determinação da CIM com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos, foram posteriormente comparados com os resultados obtidos através do método de difusão em disco, com base nas seguintes definições: erro menor – indica que um isolado é classificado como intermédio por um método

e como resistente ou sensível pelo outro; erro maior (falsa resistência) – indica que um isolado é classificado como resistente pelo método de difusão em disco e sensível pelo método de referência (CIM); erro grave (falsa sensibilidade) – indica que um isolado é classificado como sensível pelo método de difusão em disco e resistente pelo método de referência (CIM); concordância de categoria – o isolado é classificado na mesma categoria (sensível, intermédio ou resistente) por ambos os métodos; concordância essencial – apenas foram observados erros menores (Cotter & Adley, 2001).

4.3 Caracterização genotípica das estirpes

Após avaliação do perfil de susceptibilidade das estirpes, procedeu-se à extracção do ADN de cada isolado e à identificação da presença do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) e dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id*, recorrendo à técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.3.1. Extracção do ADN

A extracção de ADN iniciou-se com a suspensão de uma colónia isolada em 1ml de tampão fosfato salino (PBS - phosphate buffer saline), num tubo eppendorf, seguida de centrifugação a uma velocidade de 8000G, durante 5 minutos. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 100µl de tampão TE (10mM TRIS - 1mM EDTA pH8). Seguidamente ferveu-se a suspensão em banho-maria, durante 10 minutos. Por fim, retiraram-se 10µl do lisado para um novo tubo eppendorf e juntaram-se 90µl de tampão TE (10mM TRIS - 1mM EDTA).

4.3.2. Amplificação e identificação por PCR

Para a identificação da presença do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) foi preparada uma mistura de reacção contendo 0,2mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatos – dNTPs (2'-deoxynucleoside-5'triphosphate set; Bioline), 2,5U de Taq polimerase (Dream Taq™ DNA Polymerase; Fermentas Life Scences), 0,5µg de cada primer (Stabvida, Lda.), 1 x PCR *buffer* 0,005% (10 x Dream Taq *buffer*; Fermentas Life Scences), 20ng de ADN e água purificada, perfazendo um volume final de 50µl.

Os *primers* (oligonucleótido iniciadores) utilizados foram sintetizados comercialmente (<http://www.stabvida.com>) e usados nas reacções sob a forma de alíquotas previamente preparadas.

Os *primers* utilizados para a detecção do gene que codifica a enzima bifuncional foram: 5'-GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC-3' e 5'-CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG-3' (Donabedian et al., 2003).

As diversas misturas de reacção (uma por estirpe em análise e um controlo negativo, sem ADN) foram depois colocadas num termociclador com tampa aquecida, com o seguinte programa: 30 ciclos de cinco minutos a 95°C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 40 segundos a 72°C, seguidos por um ciclo final de 10 minutos a 72°C, mantendo-se depois a 4°C até análise por electroforese.

A presença dos genes modificadores da gentamicina, *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id*, foi analisada por PCR multiplex. Para tal preparou-se uma mistura de reacção semelhante à acima referida, contendo 0,2mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatos – dNTPs (2'-deoxynucleoside-5'triphosphate set; Bioline), 2,5U de Taq polimerase (Dream Taq™ DNA Polymerase; Fermentas Life Sciences), 0,5µg de cada primer (Stabvida, Lda.), 1 x PCR buffer 0,005% (10 x Dream Taq buffer; Fermentas Life Sciences), 20ng de ADN e água purificada, perfazendo um volume final de 50µl.

Os *primers* utilizados para a detecção do gene modificador da gentamicina *aph(2'')-Ib* foram: 5'-TATGGATTCATGGTTAACTTGGACGCTGAG-3' e 5'-ATTAAGCTTCCTGCTAAAATATAAACATCTCTGCT-3'. Para a pesquisa do gene *aph(2'')-Id* utilizou-se os seguintes *primers*: 5'-GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC-3' e 5'-CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC-3' (Donabedian et al., 2003).

O programa utilizado no PCR foi o seguinte: 30 ciclos de três minutos a 95°C, um minuto a 95°C, 50 segundos a 57°C e 40 segundos a 72°C, seguidos por um ciclo final de cinco minutos a 72°C, mantendo-se depois a 4°C até análise por electroforese.

Após a amplificação por PCR, os produtos resultantes foram visualizados com recurso a electroforese em gel de agarose 3% com de 2µl brometo de etídio 10mg/ml (1g/100 ml) com posterior visualização em transiluminador (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*: 505bp; *aph(2'')-Ib*: 850bp e *aph(2'')-Id*: 640bp).

No primeiro poço do gel foi utilizado o marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas International Inc, Ontário, Canadá) como marcador de peso molecular de ADN. O tamanho das bandas observadas pôde ser estimado por comparação com os fragmentos conhecidos do marcador.

Tabela 3. Resumo do conjunto de *primers* utilizados na amplificação dos genes em estudo

Gene	Sequência do primer (5'→3')	Produto PCR (pb)
enzima bifuncional	GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG	505
<i>aph(2'')-Ib</i>	TATGGATTCATGGTTAACTTGGACGCTGAG ATTAAGCTTCCTGCTAAAATATAAACATCTCTGCT	850
<i>aph(2'')-Id</i>	GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	640

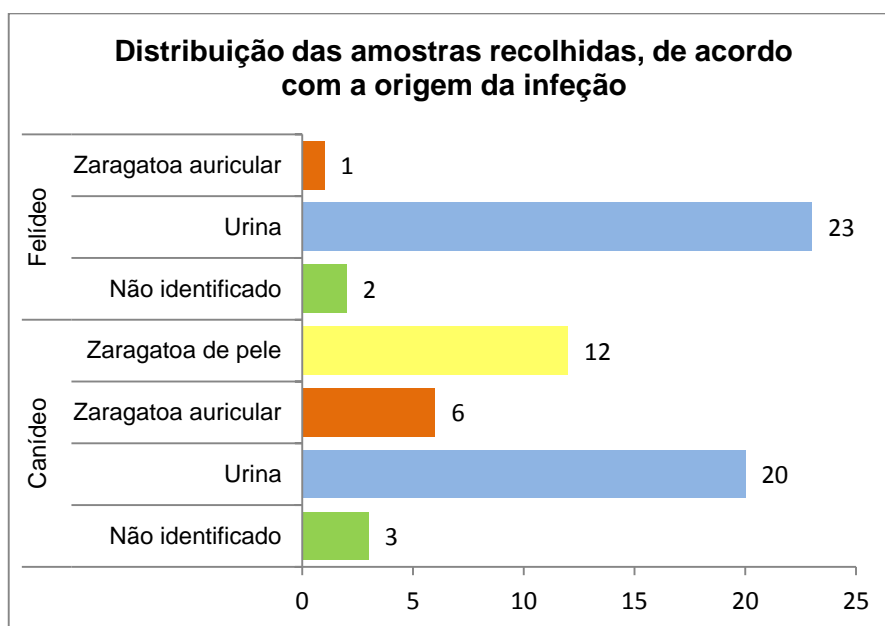
Donabedian et al., 2003.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização das estirpes

As 67 estirpes clínicas analisadas no decorrer deste estudo foram isoladas a partir de canídeos ($n=41$) e felídeos ($n=26$) com infecção do tracto urinário ($n=43$), otite externa ($n=7$) e piodermite ($n=12$) (gráfico 1).

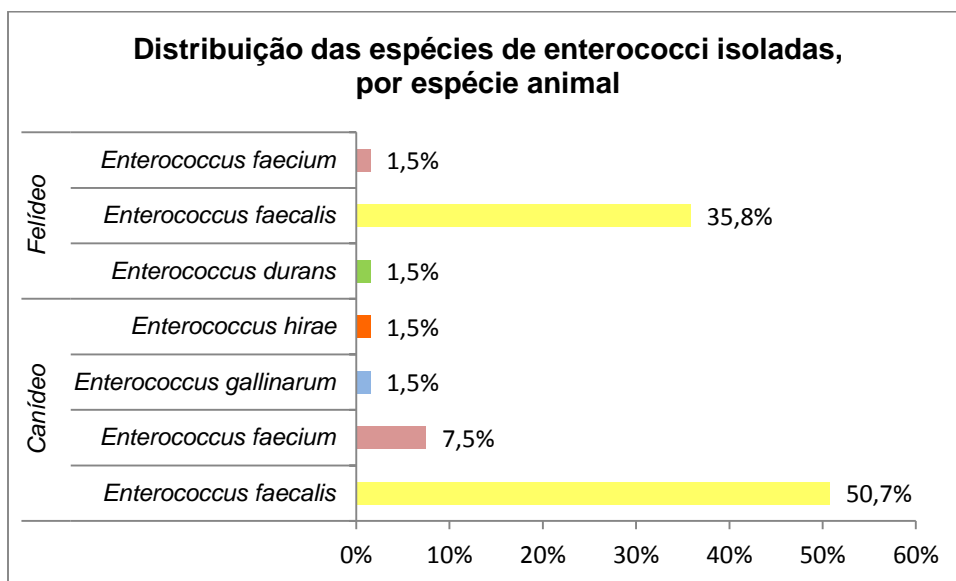
Gráfico 1: Caracterização da distribuição das amostras de estirpes clínicas recolhidas ($n=67$) de acordo com a origem da infecção



A espécie predominantemente isolada foi o *Enterococcus faecalis* (86,6%; $n=58$), tanto em canídeos (50,7%; $n=34$) como em felídeos (35,8%; $n=24$), seguida do *Enterococcus faecium* (9,0%; $n=6$). As outras espécies isoladas foram *E. durans* (1,5%; $n=1$), *E. gallinarum* (1,5%; $n=1$) e *E. hirae* (1,5%; $n=1$).

Relativamente aos *E. faecium* isolados, 7,5% ($n=5$) foram provenientes de amostras recolhidas de canídeos e 1,5% ($n=1$) de amostras recolhidas de felídeos (gráfico 2).

Gráfico 2: Caracterização da distribuição das espécies de enterococci isoladas (n=67), por espécie animal



Estes resultados estão de acordo com os dados observados em estudos prévios relativos ao isolamento de enterococci de origem animal (Thal et al., 1995; Cetinkaya et al., 2000; Shepard et al., 2002; De Leener et al., 2005; Delgado et al., 2007; Ossiprandi et al., 2008; Hwang et al., 2009 e Kataoka et al., 2013).

No entanto, nos estudos realizados por Rodrigues, Poeta, Martins & Costa (2002); Simjee, White, McDermott, Wagner, Zervos, Donabedian, English, Hayes & Walkker (2002); Poeta, Costa, Rodrigues & Torres (2006); Kojima et al. (2010); Ghosh et al. (2011) e Kataoka et al. (2013) (animais previamente expostos a antibióticos) foram obtidos resultados divergentes uma vez que o *E. faecium* foi a espécie predominantemente isolada. Também Jackson et al. (2009); Kojima et al. (2010) e Han et al. (2011) relataram resultados divergentes em algumas das espécies animais (suínos, frangos e gansos; gatos; e bovinos, respectivamente) nas quais os enterococci foram isolados.

5.2 Perfil de susceptibilidade das estirpes

Na tabela 4, podemos observar o perfil de susceptibilidade das estirpes, determinado com recurso à técnica DADE MicroScan[®] para gram positivos.

Tabela 4. Determinação das concentrações inibitórias mínimas com recurso à técnica de microdiluição DADE MicroScan[®] para gram positivos

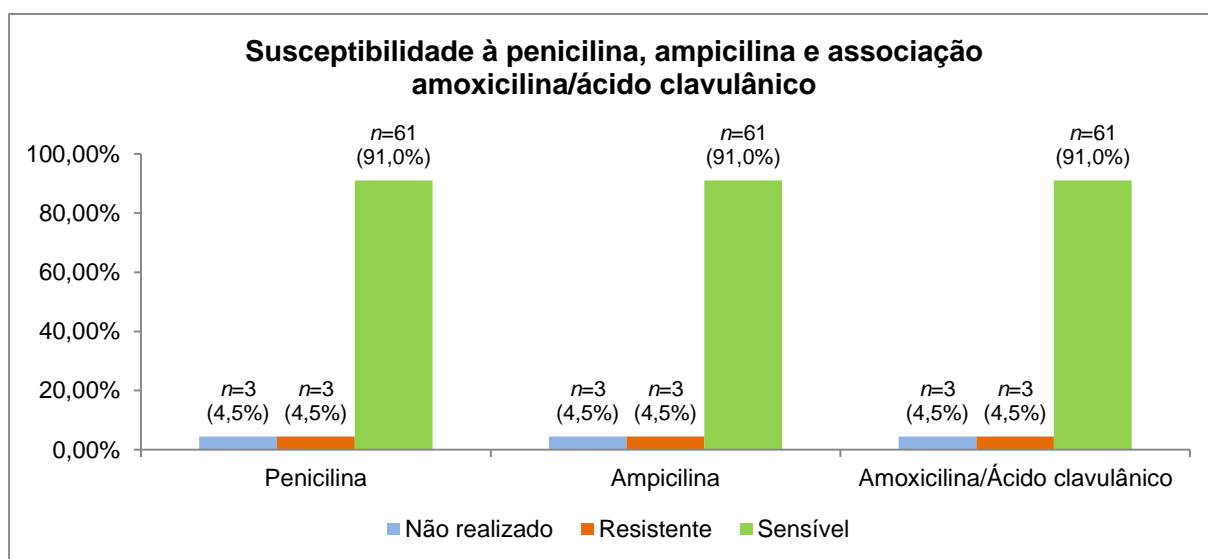
Antimicrobiano	CIM (µg/mL)		Critérios clínicos	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Susceptível	Resistente
Penicilina	2	2	≤8 ^a	≥16 ^a
Ampicilina	4	4	≤8 ^a	≥16 ^a
Amoxicilina / Ácido clavulânico	<2/1	<2/1	≤4/2 ^b	≥8/4 ^b
Vancomicina	2	2	≤4 ^a	≥32 ^a
Teicoplanina	<1	<1	≤8 ^b	≥32 ^b
Quinupristina- dalfopristina	>2	>2	≤1 ^b	≥4 ^b
Linezolida	2	4	≤2 ^b	≥8 ^b
Cloranfenicol	8	>16	≤8 ^a	≥32 ^a
Eritromicina	>4	>4	≤0.5 ^a	≥8 ^a
Tetraciclina	>8	>8	≤4 ^b	≥16 ^b
Ciprofloxacina	2	>2	≤1 ^b	≥4 ^b
Levofloxacina	2	>4	≤2 ^b	≥8 ^b
Moxifloxacina	1	>2	≤0.5 ^b	≥4 ^b
Rifampina	2	>2	≤1 ^a	≥4 ^a
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	<2/38	>2/38	≤2/38 ^b	≥4/76 ^b
Nitrofurantoína	<32	64	≤32 ^a	≥128 ^a
Gentamicina (HLGR)	-	-	≤500 ^a	>500 ^a
Estreptomicina (HLSR)	-	-	≤1000 ^a	>1000 ^a

^a Na interpretação dos resultados das CIM foram utilizados os critérios clínicos VET01-S2; ^b Na interpretação dos resultados das CIM foram utilizados os critérios clínicos propostos pelo fabricante.

A análise dos resultados obtidos permitiu verificar que as estirpes isoladas são maioritariamente sensíveis à penicilina, à ampicilina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico (gráfico 3). Observações semelhantes haviam já sido descritas por outros autores (Butaye, Devriese & Haesebrouck, 2001; Rodrigues et al., 2002; Poeta et al., 2006; Delgado et al., 2007; Kojima et al., 2010; Han et al., 2011; Kataoka et al., 2013). Pelo contrário, Thal et al. (1995); Simjee et al. (2002); Ossiprandi et al. (2008); Ghosh et al. (2011); Kwon et al. (2012); Kataoka et al. (2013) (animais previamente expostos a antibióticos) e Tremblay et al. (2013) descrevem valores muito superiores de resistência à ampicilina, especialmente em *E. faecium*. O mesmo foi descrito por Jackson et al. (2009) e Hwang et al. (2009) relativamente

à penicilina. De referir no entanto que, das três estirpes resistentes à penicilina e à ampicilina detectadas no nosso estudo, duas foram identificadas como *E. faecium* e uma como *E. durans*. Já das três estirpes resistentes aos β -lactâmicos, uma apresentava simultaneamente resistência de elevado nível à gentamicina e as restantes duas apresentavam resistência de elevado nível à estreptomicina.

Gráfico 3: Susceptibilidade das estirpes clínicas aos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina e associação amoxicilina/ácido clavulânico) - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos

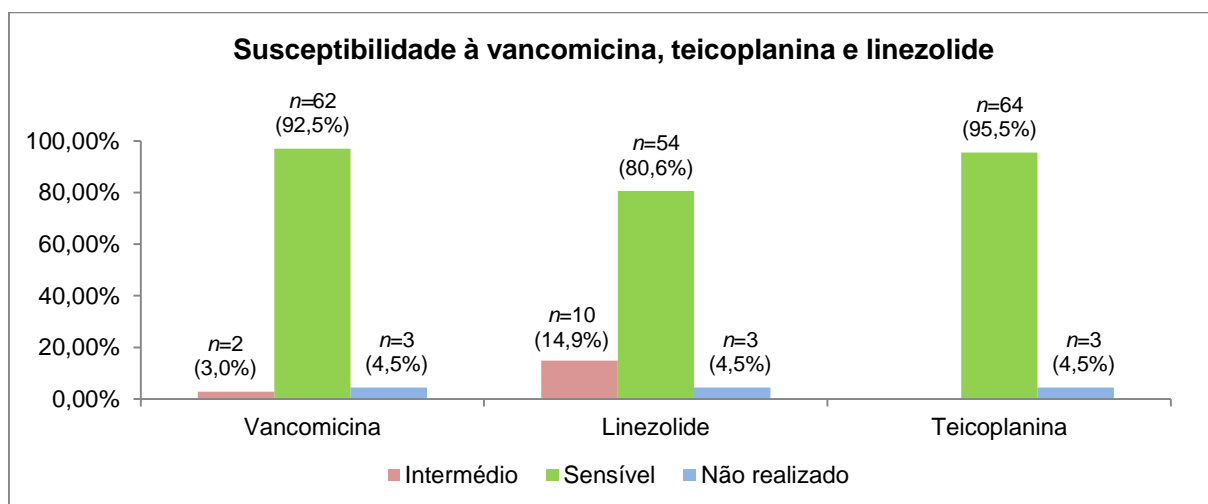


Todas as estirpes resistentes à penicilina apresentaram também resistência à ampicilina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico. O mesmo se verificou para todas as estirpes sensíveis aos β -lactâmicos (gráfico 3).

Nenhuma das estirpes estudadas apresentou resistência à vancomicina, à teicoplanina e à linezolida, antimicrobianos de eleição no tratamento de infeções nosocomiais por enterococci no Homem (gráfico 4). Resultados semelhantes foram observados, para a vancomicina, nos estudos de vários autores (Rodrigues et al., 2002; Wagenvoort, Burgers, Wagenvoort & Burgers, 2003; De Leener et al., 2005; Poeta et al. 2006; Delgado et al., 2007; Ossiprandi et al., 2008; Jackson et al., 2009; Kojima et al., 2010; Ghosh et al., 2011; Han et al., 2011; Kwon et al., 2012; Kataoka et al., 2013 e Tremblay et al., 2013). Estes resultados divergem dos descritos por Herrero et al. (2004) que relatam uma prevalência de 13% de resistência à vancomicina em enterococci isolados de cães, em Espanha. Por seu lado, Simjee et al. (2002) descrevem valores de resistência à vancomicina de 7% em *E. faecium* e 100% em *E. galinarium*. No nosso estudo, a única estirpe de *E. galinarium* isolada apresentou susceptibilidade intermédia, com CIM de 8 μ g/ml.

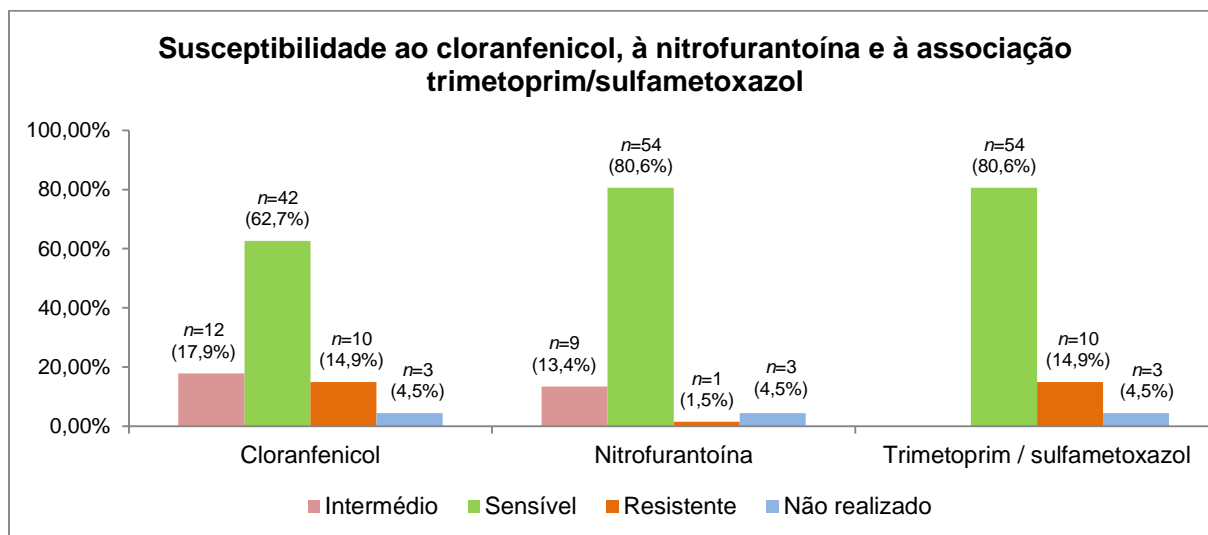
Jackson et al. (2009) e Tremblay et al. (2013) descrevem ainda resultados semelhantes para a linezolida.

Gráfico 4: Susceptibilidade das estirpes clínicas à vancomicina, à teicoplanina e à linezolida - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos



A susceptibilidade também se apresentou elevada relativamente ao cloranfenicol, à nitrofurantoína e à associação trimetoprim/sulfametoxazol (gráfico 5).

Gráfico 5: Susceptibilidade das estirpes clínicas ao cloranfenicol, à nitrofurantoína e à associação trimetoprim/sulfametoxazol - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos

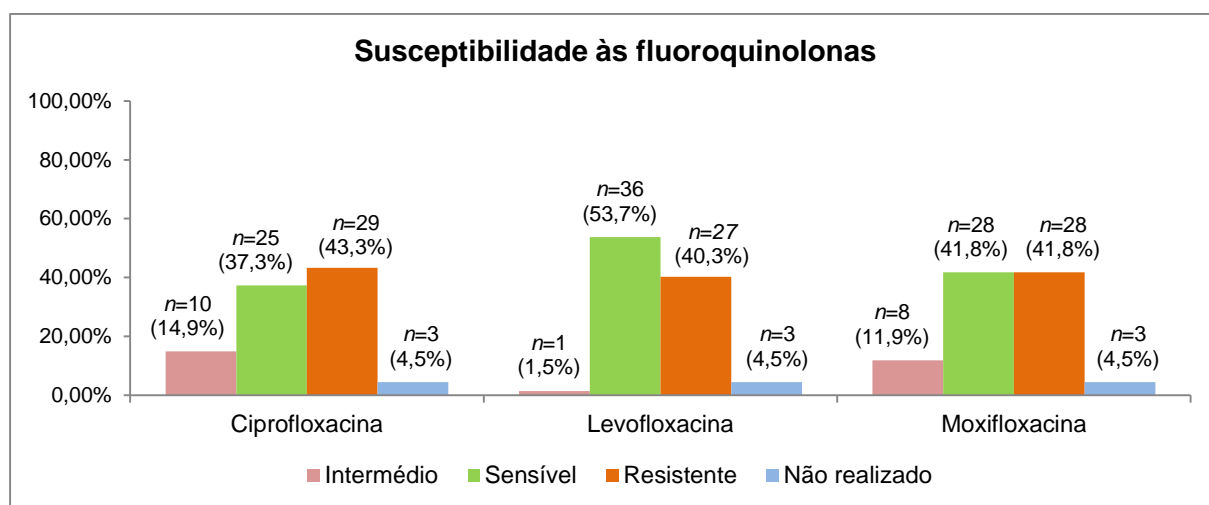


Estes resultados estão em concordância com estudos previamente descritos (De Leener et al., 2005; Poeta et al., 2006; Delgado et al., 2007; Ghosh et al., 2011; Han et al., 2011 e Tremblay et al., 2013). Kataoka et al. (2013) descrevem valores de resistência ao cloranfenicol

superiores nos grupos de animais previamente expostos ao contacto com antibióticos e valores semelhantes nos restantes grupos estudados (sem qualquer exposição prévia a antibióticos). Pelo contrário, Jackson et al. (2009) descrevem valores de resistência inferiores, tanto para a nitrofurantoína como para o cloranfenicol.

As estirpes avaliadas apresentaram valores de resistência às fluoroquinolonas na ordem dos 40% (gráfico 6).

Gráfico 6: Susceptibilidade das estirpes clínicas à ciprofloxacina, à levofloxacina e à moxifloxacina - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos

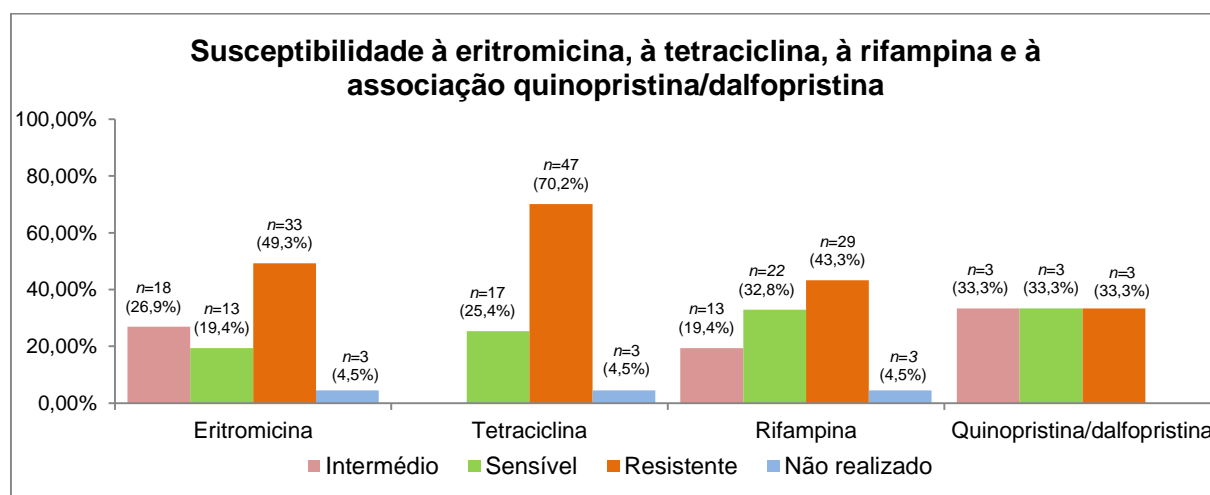


Embora elevados estes resultados mostraram-se aquém do que esperávamos, uma vez que os enterococci apresentam resistência intrínseca a este grupo de antibióticos (gene cromossomal) (Pai & Kim, 1998).

Nos seus estudos, Ossiprandi et al. (2008) e Jackson et al. (2009), descrevem valores de resistência bastante inferiores em estirpes de *E. faecalis* (apesar de os valores de resistência descritos em estirpes de *E. faecium* serem ligeiramente superiores). Os valores obtidos também divergem dos reportados por Rodrigues et al. (2002); Poeta et al. (2006) (bastante inferiores), Kwon et al. (2012) e Tremblay et al. (2013) (valores superiores) para a resistência à ciprofloxacina, em estirpes provenientes de animais de companhia. Por seu lado, Kataoka et al. (2013) descrevem valores bastante superiores nos grupos de animais expostos a antibióticos, e valores inferiores nos dois grupos sem qualquer exposição prévia a antibióticos. Observamos também valores elevados de resistência à eritromicina, à tetraciclina, à rifampina e à associação quinupristina/dalfopristina (gráfico 7). Estes resultados estão em concordância com estudos previamente descritos por De Leener et al. (2005); Delgado et al. (2007); Han et al. (2011); Kwon et al. (2012) e Kataoka et al. (2013). No entanto Ossiprandi et al. (2008) e Hwang et al. (2009) descrevem valores de resistência bastante superiores aos observados. Por seu lado, e apesar de os valores de resistência à eritromicina serem semelhantes aos obtidos

no nosso estudo, Poeta et al. (2006) reportam valores de resistência à tetraciclina bastante inferiores. O mesmo se verifica no estudo de Rodrigues et al. (2002). Quando analisamos o estudo de Simjee et al. (2002) verificamos que no caso das estirpes de *E. faecium* se descrevem valores de resistência à eritromicina e à tetraciclina relativamente semelhantes aos observados por nós, no caso das estirpes de *E. faecalis*, os valores de resistência descritos são significativamente inferiores. Tremblay et al. (2013) descrevem valores de resistência à tetraciclina e à eritromicina, ligeiramente diferentes (superiores e inferiores, respectivamente). O mesmo se verifica nos estudos de Jackson et al. (2009) e Kojima et al. (2010) que reportam valores de resistência inferiores aos obtidos neste estudo. No estudo de Ghosh et al. (2011) os valores de resistência à eritromicina e à tetraciclina encontrados são ligeiramente superiores aos observados no nosso estudo, excepto no caso da resistência à tetraciclina em estirpes de *E. faecalis*, as quais apresentam uma prevalência de resistência ligeiramente inferior.

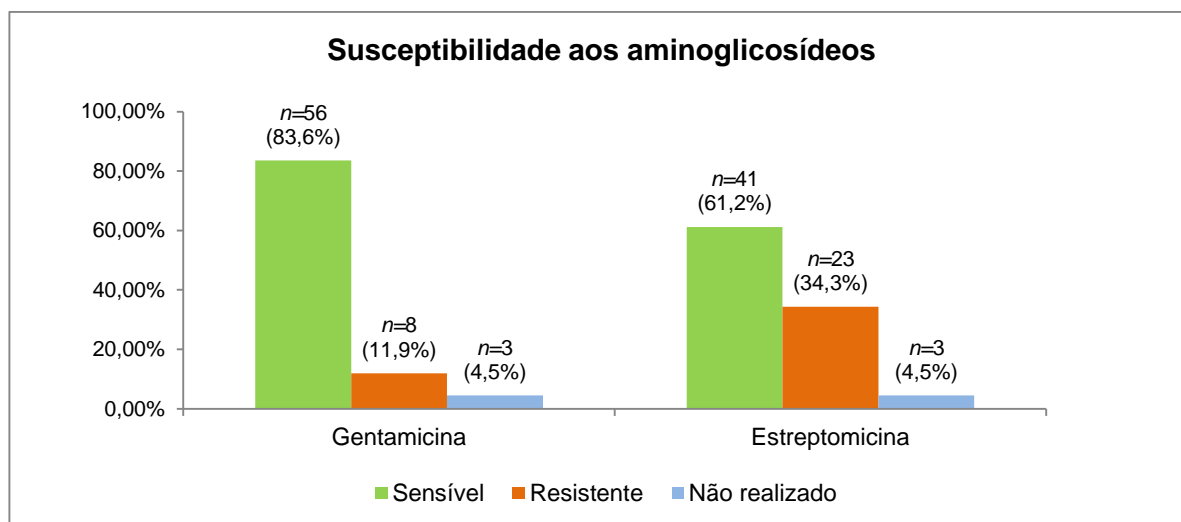
Gráfico 7: Susceptibilidade das estirpes clínicas à eritromicina, à tetraciclina, à rifampina e à associação quinopristina/dalfopristina - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.



Avaliando a totalidade das estirpes isoladas observou-se a presença de um elevado número de estirpes resistentes à quinopristina/dalfopristina (85%). Tal deveu-se principalmente ao facto de os *Enterococcus faecalis* serem intrinsecamente resistentes a esta associação (gene cromossomal *Isa*), e de esta ser a espécie predominantemente isolada (86,6%) (Klare et al., 2003; Petinaki et al., 2006; Delgado et al., 2007). Estes resultados divergem do descrito por outros autores (Cotter & Adley, 2001; De Leener et al., 2005; Poeta et al., 2006; Jackson et al., 2009 e Tremblay et al., 2013).

Após exclusão destas estirpes (*E. faecalis*) e avaliação da susceptibilidade das restantes espécies (*E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*; $n=9$) verificou-se que os valores de resistência observados foram inferiores (33,3%) (gráfico 7).

Gráfico 8: Susceptibilidade das estirpes clínicas a elevados níveis aminoglicosídeos - ensaios de microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos.



Foram identificados oito estirpes resistentes a elevados níveis de gentamicina (HLGR) e 23 estirpes resistentes a elevados níveis de estreptomicina (HLSR) (gráfico 8). Destes, sete apresentavam resistência de elevado nível a ambos os aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) – resistência combinada. Apesar de os valores de HLGR e resistência combinada encontrados serem semelhante aos previamente descritos por diversos autores, os valores de HLSR foram superiores (Thal et al., 1995; Butaye et al., 2001; Lopes et al., 2003; De Leener et al., 2005; Poeta et al., 2006). Ao analisarmos os estudos de Simjee et al. (2002) e Ghosh et al. (2011) verificamos que a resistência de elevado nível à gentamicina observada foi bastante superior nos *E. faecium* quando comparada com a observada em *E. faecalis*. No entanto, os nossos dados não demonstraram um padrão semelhante, sendo que das oito estirpes HLGR encontradas, sete foram identificadas como *E. faecalis* e apenas uma foi identificada como *E. faecium*. Han et al. (2011) descrevem um padrão semelhante, com excepção das estirpes provenientes de suínos, nos quais a maioria das estirpes HLAR foi identificada como *E. faecium*. Ghosh et al. (2011), Han et al. (2011) (excepto bovinos) e Tremblay et al. (2013) descrevem valores de resistência à gentamicina superiores aos observados no nosso estudo. Esta diferença é muito menos marcada no caso da estreptomicina (Ghosh et al., 2011 e Tremblay et al., 2013). Por seu lado, os valores de resistência descritos por Jackson et al. (2009) e Jackson et al. (2010) são inferiores, tanto para a gentamicina, como para a estreptomicina.

5.3 Determinação da susceptibilidade por difusão em disco *versus* CIM

Após a comparação dos resultados obtidos através do método de difusão em disco com os resultados obtidos com os ensaios de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos, verificou-se que ambos os métodos detectaram a totalidade das oito estirpes resistentes a elevados níveis de gentamicina (HLGR). Das 23 estirpes resistentes a elevados níveis de estreptomicina (HLSR) quatro foram classificadas de forma diferente por ambos os métodos, resultando em dois erros menores, um erro maior e um erro grave. Por seu lado, os discos de gentamicina (CN) e estreptomicina (STR) 10µg mostraram-se pouco fiáveis na avaliação da resistência de elevado nível, uma vez que um número elevado de estirpes foi classificado como resistente ou intermédio pelo método de difusão em disco, mostrando-se sensíveis quando avaliados pelo método de referência (CIM).

Todas as estirpes classificadas como resistentes à penicilina pelo método de CIM apresentaram também resistência aos restantes β -lactâmicos avaliados (ampicilina e amoxicilina). O mesmo se verificou para as estirpes sensíveis.

Quando comparámos os dois métodos utilizados verificámos duas divergências nos resultados para a penicilina, tendo identificado dois erros maiores (duas estirpes classificadas como resistentes pelo método de difusão em disco e como sensíveis pelo método de referência). No caso da ampicilina não se observou qualquer discrepância. Os resultados obtidos vão de acordo ao descrito em estudos prévios que referem a necessidade de testar tanto a penicilina como a ampicilina como forma de determinar a resistência dos enterococci aos β -lactâmicos, preferencialmente com recurso ao método CIM (Kaçmaz & Aksoy, 2005).

Tabela 5. Comparação entre os métodos de ensaios de microdiluição (CIM) e difusão em disco na detecção de resistência à penicilina, ampicilina, vancomicina e de resistência de elevado nível aos aminoglicosídeos

Concentração Inibitória Mínima ^a (µg/ml)	Método de Difusão em Disco ^b																				
	Nº de estirpes																				
	CN 10µg			CN 120µg			STR 10µg ^c			STR 300µg			P 10U.I.			AMP 10µg			VA 30µg		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Gentamicina																					
≥ 500 (n=8)	8	0	0	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
< 500 (n=56)	46	5	5	0	0	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não realizado (n=3)	3	0	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estreptomicina																					
≥ 1000 (n=23)	-	-	-	-	-	-	23	0	0	21	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
< 1000 (n=41)	-	-	-	-	-	-	41	0	0	1	1	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não realizado (n=3)	-	-	-	-	-	-	3	0	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina																					
≥ 16 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-
≤ 8 (n=61)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	59	-	-	-	-	-	-
Não realizado (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	3	-	-	-	-	-	-
Ampicilina																					
≥ 16 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	-	-	-
≤ 8 (n=61)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	61	-	-	-
Não realizado (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ^d	0 ^d	3 ^d	-	-	-

Tabela 5 (continuação). Comparação entre os métodos de ensaios de microdiluição (CIM) e difusão em disco na detecção de resistência à penicilina, ampicilina, vancomicina e de resistência de elevado nível aos aminoglicosídeos

Concentração Inibitória Mínima ^a (µg/ml)	Método de Difusão em Disco ^b																				
	Nº de estirpes																				
	CN 10µg			CN 120µg			STR 10µg ^c			STR 300µg			P 10U.I.			AMP 10µg			VA 30µg		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Vancomicina																					
≥ 32 (<i>n</i> =0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
8 - 16 (<i>n</i> =2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2	0
≤ 8 (<i>n</i> =62)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	26	20
Não realizado (<i>n</i> =3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2	1

AMP: ampicilina; STR: estreptomicina; CN: gentamicina; P: penicilina; VA: vancomicina; R: resistente; I: intermédio; S: sensível; ^a Foram aplicados os critérios clínicos VET01-S2; ^b Foram aplicados os critérios clínicos VET01-S2 para a interpretação dos discos CN 10µg (S≥15mm, R≤12mm), P 10U.I. (S≥15mm, R≤14mm), AMP 10µg (S≥17mm, R≤16mm), VA 30µg (S≥17mm, R≤14mm), CN 120µg (S≥10mm, R≤6mm) e STR 300µg (S≥10mm, R≤6mm); ^c Foram aplicados os critérios clínicos NCCLS M31-A2 para a interpretação dos discos aSTR 10µg (S≥15mm, R≤12mm); ^d não realizado um Teste de Sensibilidade a Antibióticos - TSA.

Conforme previamente referido por Satake, Clark, Rimland, Nolte & Tenover (1997), verificámos que a avaliação da susceptibilidade de estirpes de enterococci à vancomicina através do método de difusão em disco é menos eficaz do que o recurso aos métodos de microdiluição. Das 62 estirpes identificadas como sensíveis pelo método CIM, 16 foram identificadas como resistentes (erro maior), 26 como intermédias (erro menor) e apenas 20 foram correctamente identificadas como sensíveis, pelo método de difusão em disco. Duas estirpes foram identificadas como intermédias por ambos os métodos (34,4% de concordância de categoria e 75,0% de concordância essencial).

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de difusão em disco e ensaio de microdiluição (CIM)

Antibióticos	Número de erros			% Concordância de categoria	% Concordância essencial
	Erro menor	Erro maior	Erro grave		
Gentamicina 10µg	5	46	0	20,3	28,1
Gentamicina 120µg	0	0	0	100,0	100,0
Estreptomicina 10µg	0	41	0	35,9	35,9
Estreptomicina 300µg	2	1	1	93,8	96,9
Penicilina 10U.I.	0	2	0	96,9	96,9
Ampicilina 10µg	0	0	0	100,0	100,0
Vancomicina 30µg	26	16	0	34,4	75,0
Todos	33	106	1	-	-
% para todos os testes	7,3	23,7	0,2	68,8	76,1

A análise dos resultados obtidos demonstrou ainda que os discos de alta concentração de gentamicina (gentamicina 120µg) apresentaram resultados 100% concordantes com os obtidos pela CIM, ao contrário do verificado para os discos de alta concentração de estreptomicina (estreptomicina 300µg – 93,8% de concordância de categoria e 96,9% de concordância essencial). A percentagem de concordância obtida neste estudo diverge das descritas por Cotter e Adley (2001) e Lopes et al. (2003) nos seus estudos, nos quais foram observados erros menores e erros graves, respectivamente, na comparação dos resultados obtidos pelos discos de alta concentração de gentamicina e as CIM. Uma vez que a presença de estirpes resistentes a elevados níveis de aminoglicosídeos pode afectar a escolha da terapêutica a implementar, consideramos importante a realização de testes de susceptibilidade antes de iniciar a terapêutica antimicrobiana. Apesar das discrepâncias observadas, e atendendo ao uso restrito da estreptomicina na clínica de pequenos animais (especialmente devido à sua toxicidade, principalmente em gatos) consideramos os erros observados aceitáveis e acreditamos que o uso de discos de alta concentração de gentamicina e estreptomicina seria uma alternativa segura e fiável na avaliação de rotina da susceptibilidade de estirpes de enterococci aos aminoglicosídeos. Kaçmaz e Aksoy (2005) já

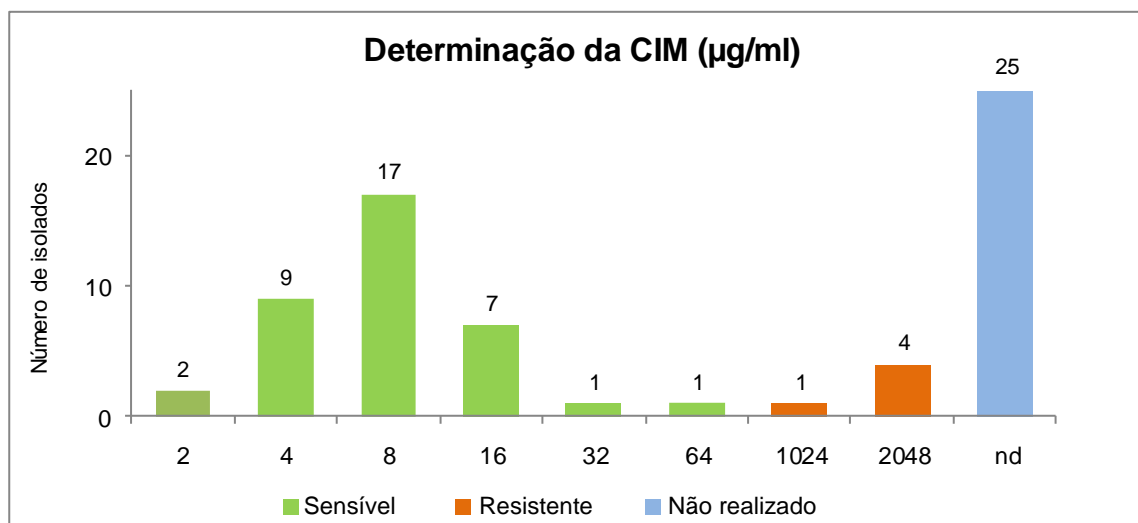
havam descrito uma boa correlação nos dados obtidos por ambos os métodos, defendendo também a fiabilidade do uso de discos de elevada concentração de aminoglicosídeos na avaliação da sensibilidade dos enterococci. Pelo contrário, os discos de gentamicina e estreptomicina 10µg mostraram-se muito pouco fiáveis, não devendo por isso ser utilizados. No que diz respeito aos β-lactâmicos, a comparação entre os dois métodos demonstrou que os discos de ampicilina 10µg apresentaram resultados semelhantes aos obtidos pelos discos de alta concentração de gentamicina, sendo 100% concordantes com os resultados obtidos pela CIM. Por outro lado, os discos de Penicilina 10U.I. apresentaram resultados ligeiramente inferiores com 96,9% de concordância de categoria e de concordância essencial.

5.4 Determinação da susceptibilidade por microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth versus microdiluição com recurso a DADE MicroScan® para gram positivos

Quando comparámos as duas técnicas de microdiluição para determinação da CIM (microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth e DADE MicroScan® para gram positivos) verificámos que, nas 42 estirpes nos quais foram realizadas ambas as técnicas, os resultados mostraram-se 100% concordantes no respeitante à identificação de estirpes resistentes a elevados níveis de gentamicina (anexo 7).

A microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth permitiu ainda determinar a CIM exacta de cada uma das estirpes analisadas (gráfico 9 e anexo 7), ao contrário da DADE MicroScan®, que no caso das estirpes HLRA apenas permite avaliar o desempenho dos despistes sinérgicos com gentamicina e estreptomicina (resistente ou sensível).

Gráfico 9: Determinação da CIM da gentamicina pelo método de microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth



A análise cumulativa das CIM demonstrou que CIM₅₀ foi de 8µg/ml e a CIM₉₀ foi de 1024µg/ml. A microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth permitiu ainda verificar que, ao contrário do descrito por diversos autores, nem todas as estirpes clínicas apresentam resistência de baixo nível à gentamicina (11 estirpes apresentaram CIM ≤ 4µg/ml, classificadas como sensíveis de acordo com os critérios clínicos VET01-S2) (anexo 7). Esta observação contraria também o descrito por Lopes et al. (2003) que defende que apenas as estirpes provenientes de produtos alimentares podem não apresentar resistência de baixo nível à gentamicina, mas vai de encontro aos dados apresentados pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) no que concerne a distribuição de CIM nos enterococci “wild-type” (definida como população susceptível sem resistências desenvolvidas ou adquiridas) [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2013].

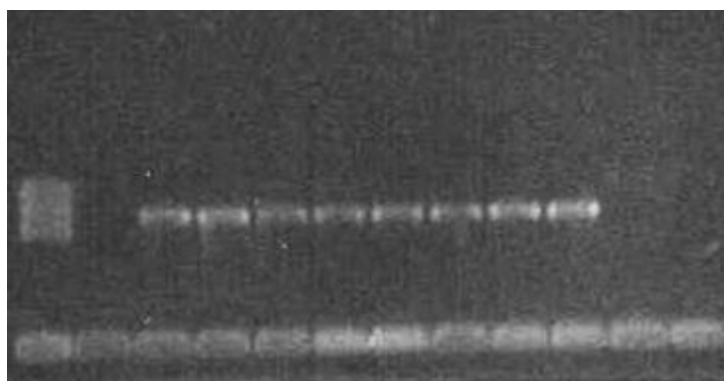
A vantagem observada na utilização da DADE MicroScan[®] para gram positivos em detrimento da técnica padrão de microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth, para além da maior rapidez e facilidade de execução, prende-se com o facto de permitir simultaneamente, e com uma única placa de microdiluição, avaliar o perfil de susceptibilidade a diversos antibióticos importantes para a prática clínica (tais como penicilina, ampicilina, gentamicina e vancomicina, entre outros, num total de 18) (anexo 2).

5.5 Amplificação / identificação do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')*-*le-aph(2'')*-*la*) e dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')*-*lb* e *aph(2'')*-*ld*

Na última fase do trabalho, procedeu-se à amplificação e identificação do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')*-*le-aph(2'')*-*la*) e dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')*-*lb* e *aph(2'')*-*ld*, recorrendo às técnicas PCR atrás descritas, em todas as estirpes anteriormente identificados como resistentes a elevados níveis de gentamicina (HLGR).

Em todas as oito estirpes HLGR identificadas foi possível amplificar o gene que codifica a enzima bifuncional (figura 2). Desta forma, verificou-se que no caso das estirpes isoladas, a presença de resistência de elevado nível à gentamicina podia ser explicada pela presença desta enzima.

Figura 2. Imagem de gel de agarose 3% após electroforese dos produtos do PCR da enzima bifuncional (*aac(6')*-*le-aph(2'')*-*la*) - (505bp).



Ladder (poço 1); 30X/02 (poço 2); 53/02 (poço 3); 344/03 (poço 4); 337/03 (poço 5); 1420C/05 (poço 6); 3626/03 (poço 7); 6735/06 (poço 8); 6736B/06 (poço 9); 7175/07 (poço 10); ATCC29212 (poço 11); Controlo negativo (poço 12).

As estirpes 30X/02 e ATCC29212 foram utilizadas como controlos negativos uma vez que se sabia à partida que eram estirpes sensíveis a elevados níveis de gentamicina. Os resultados observados (ausência de banda nos poços 2 e 11) vão por isso ao encontro do esperado. As bandas observadas nos restantes poços (3 a 10) correspondem à amplificação do gene que codifica a enzima bifuncional nas estirpes previamente identificadas como HLGR. A ausência de banda no poço 12 (controlo negativo do PCR) valida o ensaio, uma vez que demonstra que não ocorreu contaminação do PCR.

No PCR dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')*-*lb* e *aph(2'')*-*ld*, não ocorreu a amplificação de nenhum dos genes. Verificámos assim que, nas estirpes isoladas não se verifica a presença concomitante de dois ou mais dos genes em estudo.

Os resultados obtidos vão de encontro ao anteriormente descrito por diversos autores, que identificaram a presença da enzima bifuncional como a origem mais frequente de resistência a elevados níveis de gentamicina, e referem o facto de não se observar a presença concomitante de dois ou mais genes (Chow et al., 1998; Tsai et al., 1998; Donabedian et al., 2003; Lopes et al., 2003; Poeta et al., 2006; Jackson et al., 2010; Tremblay et al., 2013).

No entanto, Vakulenko et al. (2003) no seu trabalho referem a identificação de uma estirpe que continha dois genes, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(2'')-Ic*.

5.6 Discussão

A resistência bacteriana aos antibióticos é um tema cada vez mais preocupante a nível global, constituindo um grave e proeminente problema de saúde pública.

Quando consideramos diversos factores, tais como, o aparecimento dos *E. faecalis* e *E. faecium* como agentes patogénicos nosocomiais, a sua distribuição ubiquitária e a capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, o contacto próximo entre o Homem e os seus animais de companhia, o uso das mesmas classes de antibióticos tanto em medicina, como em medicina veterinária, o aparecimento de estirpes multi-resistentes e a localização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de resistências em elementos móveis (o que pode favorecer a transferência de genes de resistência entre a microbiota humana e animal), verificamos que se torna imperativo determinar a prevalência de estirpes clínicas resistentes nos animais de companhia e a sua importância como reservatórios de genes de resistência. Tal necessidade torna-se ainda mais evidente quando se verifica que existe uma reduzida quantidade de dados referentes ao uso de antimicrobianos e à ocorrência de resistências nos animais de companhia (Centinkaya et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Klare et al., 2003; Guardabassi et al., 2004; Herrero et al., 2004; De Leener et al., 2005; Delgado et al. 2007; Lloyd, 2007; Guardabassi et al., 2008; Weese, 2008; Jackson et al., 2009; Jackson et al., 2010; Ghosh et al., 2011; Kwon et al., 2012; de Jong et al., 2013; Kataoka et al., 2013; Tremblay et al., 2013).

O principal antibiótico utilizado no tratamento de infecções por enterococci, em animais, é a ampicilina. Os aminoglicosídeos são normalmente utilizados em combinação com a ampicilina (efeito sinérgico e bactericida), no tratamento de infecções graves (Landman & Quale, 1997; Guardabassi et al., 2008). Felizmente, a maioria das estirpes clínicas mantêm-se susceptíveis aos β -lactâmicos. De acordo com a nossa experiência clínica, a maioria das infecções provocadas por estirpes HLAR podem ser controladas com modificações na posologia da ampicilina (aumento da dose e diminuição do intervalo entre administrações). Este facto é de extrema importância pois permite evitar a utilização *off-label* de antibióticos licenciados para uso exclusivo em medicina Humana. No entanto, não evita a necessidade e importância de

se realizarem testes de susceptibilidade aos antibióticos para determinação do perfil de susceptibilidade e determinação da terapêutica adequada para cada caso clínico.

O contacto próximo que se verifica entre o Homem e seus animais de companhia constitui um factor de risco que pode favorecer a transferência de genes de resistência entre a microbiota humana e animal. Como potencial fonte de transmissão de bactérias resistentes têm sido alvo de pouco interesse, quando comparados com os animais de produção, apesar de já existirem programas de monitorização em alguns países europeus que contemplam os animais de companhia (tais como o *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* - DANMAP na Dinamarca, o *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring* - SVARM na Suécia, o *Monitoring Programme for Antimicrobial Resistance in Animal Pathogens and the Food Production Sectors* - NORM-VET na Noruega e o *European Target Pathogen Resistance Monitoring Program of Companion Animals* - ComPath em dez países Europeus, entre outros).

Adicionalmente, a crescente preocupação com o bem estar-animal, aliada a uma maior disponibilidade económica, origina, em muitos casos, uma política de facilitismo na prescrição de antibióticos, especialmente em casos de diagnóstico incerto, de risco de infecções secundárias, de selecção empírica de antibióticos (por não realização de TSA), de medo de possível falha terapêutica, pressão por parte dos proprietários e pressões comerciais por parte dos grupos farmacêuticos, podendo levar ao uso inapropriado dos fármacos antimicrobianos, especialmente de antibióticos de largo espectro. Este aumento do uso de antibióticos de largo espectro parece estar relacionado com a emergência de bactérias patogénicas nosocomiais multi-resistentes (Guardabassi et al., 2004).

Os factos acima apresentados, juntamente com o uso das mesmas classes de antibióticos tanto em medicina como em medicina veterinária e a localização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de resistências em elementos móveis reforçam a necessidade de implementar estudos e sistemas de vigilância epidemiológica.

Estes factos alertam ainda para a importância do desenvolvimento de acções de sensibilização (junto dos profissionais de saúde e da população em geral) para a importância necessidade de fazer um uso prudente dos antibióticos, como forma de minimizar o desenvolvimento de resistências e salvaguardar a sua eficácia clínica.

6 Conclusões

O presente trabalho caracterizou e avaliou o perfil de susceptibilidade das estirpes clínicas de *Enterococcus*, tendo-se verificado que as estirpes isoladas são maioritariamente sensíveis à vancomicina, à teicoplanina, à linezolida, à penicilina, à ampicilina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico. A susceptibilidade também se apresentou elevada relativamente ao cloranfenicol, à nitrofurantoína e à associação trimetoprim/sulfametoxazol. Por outro lado, observámos valores elevados de resistência às fluoroquinolonas, à eritromicina, à tetraciclina, à rifampina e à associação quinupristina/dalfopristina. Também foram identificadas diversas estirpes resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos (oito estirpes HLGR, 23 estirpes HLSR, sendo que destas, sete apresentavam resistência combinada).

A comparação entre os diferentes métodos de avaliação de susceptibilidade permitiu concluir que, os discos de alta concentração de gentamicina e estreptomicina são uma alternativa segura e fiável na avaliação de rotina da susceptibilidade de estirpes de enterococci aos aminoglicosídeos, ao contrário dos discos de gentamicina 10µg, estreptomicina 10µg e vancomicina 30µg, que se mostraram muito pouco fiáveis. Desta forma, a avaliação da resistência aos glicopéptidos deve ser sempre realizada através da determinação da CIM. No que diz respeito aos discos de ampicilina 10µg e penicilina 10U.I. estes também se mostraram fiáveis, apesar de se verificar a necessidade de testar tanto a penicilina como a ampicilina como forma de determinar a resistência dos enterococci aos β-lactâmicos.

A microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth permitiu ainda verificar que nem todas as estirpes clínicas apresentam resistência de baixo nível à gentamicina, ao contrário do esperado.

A realização de PCR para a amplificação e identificação do gene que codifica a enzima bifuncional (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) e dos genes modificadores da gentamicina *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id*, em todas as estirpes HLGR, demonstrou que a resistência nestas estirpes se deve em exclusivo à presença da enzima bifuncional. A identificação da presença desta enzima exclui o uso terapêutico de todos os aminoglicosídeos, com excepção da estreptomicina, e levanta problemas na escolha da terapêutica a implementar, uma vez que pode condicionar a eficácia da mesma.

Apesar das limitações do estudo apresentado, devidas sobretudo ao facto de o mesmo ter sido realizado em várias etapas (por vezes separadas por largos períodos de tempo), às limitações financeiras do mesmo, ao facto de todas as estirpes avaliadas terem sido isoladas no Laboratório de Análises Clínicas Professor Doutor Braço Forte da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (e por isso provenientes, na sua grande maioria, de animais residentes na área de Lisboa) e ao desconhecimento da história clínica, acreditamos que os resultados obtidos fornecem dados bastante relevantes relativos à susceptibilidade das estirpes clínicas de enterococci e à prevalência de resistências. Acreditamos ainda que

seria interessante aprofundar esta avaliação, procedendo à recolha de um maior número de estirpes clínicas ao longo de todo o território nacional, caracterizando os mecanismos moleculares (caracterização genotípica) de resistência a outros antibióticos de interesse terapêutico (tal como os β -lactâmicos e os glicopéptidos) e implementando um sistema de vigilância epidemiológica a nível nacional. Poder-se-ia ainda criar um protocolo que permitisse avaliar a possibilidade de os donos dos animais clinicamente doentes terem sido infectados ou estarem colonizados por enterococci resistentes e posteriormente proceder à comparação das estirpes isoladas com as estirpes veterinárias.

7 Bibliografia

- Amyes, S. G. B. (2007). Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, suppl. 3, S43-S52.
- Arias, C. A. & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus* beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 266-278.
- Arsène, S. & Leclercq, R. (2007). Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (9), 3254-3258.
- Butaye, P., Devriese, L. A. & Haesebrouck, F. (2001). Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (5), 1374-1378.
- Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), 686-707.
- Chow, J. W., Donabedian, S. M., Clewell, D. B., Sahm, D. F. & Zervos, M. J. (1998). In vitro susceptibility and molecular analysis of gentamicin-resistant enterococci. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 32, 141-146.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement*. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition*. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA.
- Cotter, G. & Adley, C. C. (2001). Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10), 3753-3756.
- Cremniter, J., Mainardi, J. L., Josseaume, N., Quincampoix, J. C., Dubost, L., Hugonnet, J. E., Marie, A., Gutmann, L., Rice, L. B. & Arthur, M. (2006). Novel mechanism of resistance to glycopeptide antibiotics in *Enterococcus faecium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (43), 32254-32262.
- de Jong, A., Thomas, V., Klein, U., Marion, H., Moyaert, H., Simjee, S. & Vallé, M. (2013). Pan-European resistance monitoring programmes encompassing food-borne bacteria and target pathogens of food-producing and companion animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41, 403-409.
- De Leener, E., Decostere, A., Graef, E. M., Moyaert, H. & Haesebrouck, F. (2005). Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. *Microbial Drug Resistance*, 11 (4), 395-403.
- Delgado, M., Neto, I., Correia, J. H. D. & Pomba, C. (2007). Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 93-100.
- Donabedian, S. M., Thal, L. A., Hershberger, E., Perri, M. B., Chow, J. W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden,

- J., Angulo, F. & Zervos, M. J. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (3), 1109-1113.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2009). EARSS Annual Report 2008 - On going Surveillance of *S. pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*. Neatherlands: EARSS. RIVM: 210624003, ISBN: 978-90-6960-236-3.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Acedido em Julho, 25, 2013, em <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=49&Specium=-1>
- Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*, *Microbiology*, 155, 1749-1757.
- French, G. L. (2005). Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1514-1527.
- Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y. & Courvalin, P. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA Journal*, 17, 251-262.
- Ghosh, A., Dowd, S. E. & Zurek, L. (2011). Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS ONE*, 6 (7), e22451.
- Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 321-332.
- Guardabassi L., Jensen, L. B. & Kruse, H. (2008). Guide to antimicrobial use in animals. Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.
- Hammerum, A. M. (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 619-625.
- Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S. N., Ko, G., Sadowsky, M. J. & Hur, H. G. (2011). The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 387-392.
- Herrero, I. A., Fernández-Garayzábal, J. F., Moreno, M. A. & Domínguez, L. (2004). Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3), 1384-1385.
- Hollenbeck, B. L. & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanism in enterococcus. *Virulence*, 3 (5), 421-433.
- Hwang, I. Y., Ku, H. O., Lim, S. K., Park, C. K., Jung, G. S., Jung, S. C. & Nam, H. M. (2009). Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of enterococci isolated from pigs and chickens in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 858-862.

- Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Davis, J. A., Barrett, J. B. & Frye, J. G. (2009). Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1269-1278.
- Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Davis, J. A., Barrett, J. B., Brousse, J. H., Gustafson, J. & Kucher, M. (2010). Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in United States. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2171-2179.
- Johnston, L. M. & Jaykus, L. A. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (5), 3133-3137.
- Kaçmaz, B. & Aksoy, A. (2005). Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 535-538.
- Kataoka, Y., Ito, C., Kawashima, A., Ishii, M., Yamashiro, S., Harada, K., Ochi, H. & Sawada, T. (2013). Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from dogs and cats subjected to differing antibiotic pressures. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75 (6), 749-753.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269-290.
- Kojima, A., Morioka, A., Kijima, M., Ishihara, K., Asai, T., Fujisawa, T., Tamura, Y. & Takahashi, T. (2010). Classification and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan. *Zoonoses and Public Health*, 57, 137-141.
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Antimicrobial Resistance*, 34, 482-492.
- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T. L., Monnet, D. L. & Hammerum, A. M. (2006). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of an animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2), 596-599.
- Lloyd, D. H. (2007). Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clinical Infectious Diseases*, 45, S148-S152.
- Lopes, M. F. S., Ribeiro, T., Martins, M., P., Tenreiro, R. & Crespo, T. B. (2003). Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 214-219.
- Murray, B. E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3 (1), 46-65.
- Mutnick, A. H., Biedenbach, D. J. & Jones, R. N. (2003). Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY antimicrobial surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 63-68.
- Nilsson, O. (2012). Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infection Ecology and Epidemiology*, 2, 16959.

- Ogier, J. C. & Serror P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
- Ossiprandi, M. C., Bottarelli, E., Cattabiani, F. & Bianchi, E. (2008). Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 *Enterococcus* strains isolated from dogs in Italy. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 1-9.
- Pai, C. H. & Kim M. (1998). Antimicrobial resistance in enterococci. *Yonsei Medical Journal*, 39 (6), 554-561.
- Petinaki, E., Kontos, F., Maniatis, A. N., Spiropoulou, I. & Liakos, P. (2006). Emergence of *Enterococcus faecalis* susceptible to quinupristin/dalfopristin in Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 151-158.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. & Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 131-137.
- Rodrigues, J., Poeta, P., Martins, A. & Costa, D. (2002). The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49 (6), 278-280.
- Satake, S., Clark, N., Rimland, D., Nolte, F. S. & Tenover, F. C. (1997). Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (9), 2325-2330.
- Shepard, B. D. & Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4, 215-224.
- Sherman, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 1, 3-97.
- Simjee, S. & Gill, M. J. (1997). Gene transfer, gentamicin resistance and enterococci. *Journal of Hospital Infection*, 36, 249-259.
- Simjee, S., White, D. G., McDermott, P. F., Wagner, D. D., Zervos, M. J., Donabedian, S. M., English, L.L., Hayes, J. R. & Walker, R. D. (2002). Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (12), 4659-4665.
- Singh, K. V., Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6), 1845-1850.
- Thal, L. A., Chow, J. W., Mahayni, R., Bonilla, H., Perri, B., Donabedian, S. A., Silverman, J., Taber, S. & Zervos, M. J. (1995). Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (9), 2112-2115.
- Tremblay, C. L., Charlebois, A., Masson, L. & Archambault, M. (2013). Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. *Frontiers in Microbiology*, volume 4, Article 245.
- Tsai, S. F., Zervos, M. J., Clewell, D. B., Donabedian, S. M., Sahm, D. F. & Chow, J. W. (1998). A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2'')-Id*, in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (5), 1229-1232.

- Vakulenko, S. B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A. & Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (4), 1423-1426.
- Wagenvoort, J. H. T., Burgers, D. M. T., Wagenvoort, T. H. C. & Burgers E. (2003). Absence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in companion dogs in the conurbation of Parkstad Limburg, The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (3), 532.
- Weese, J. S. (2008). Antimicrobial resistance in companion animals. *Animal Health Research Reviews*, 9, 169–176.
- Werner, G., Klare, I. & Witte, W. (2002). Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 81-94.
- Werner, G., Coque, T. M., Franz, C. M. A. P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W. & Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci – Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 360-379.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1 - Instruções de utilização DADE MicroScan® para gram positivos

Pirrolidoniol-β-naftilamida (PYR): Os organismos que produzem pirrolidonase quebram a L-pirrolidoniol-β-naftilamida em L-pirrolidona e β-naftilamina, que se combina com o reagente de peptidase (p-dimetil-aminocinnamaldeído) para produzir uma cor vermelha.

Arginina (ARG): A desidrolação da arginina resulta na alcalinização do meio, que é detectada por uma mudança da cor amarela para a cor vermelha no indicador vermelho de fenol.

Ureia (URE): A enzima urease quebra a ureia formando amoníaco. O aumento de pH resultante é detectado pelo indicador vermelho de fenol.

Hidratos de Carbono (RAF, LAC, TRE, MNS, SOR, ARA, RBS, INU, MAN): A fermentação de um hidrato de carbono específico origina uma formação de ácidos. A consequente diminuição do pH é detectada através do indicador vermelho de fenol, que fica amarelo.

NaCl a 6,5% (NACL): A tolerância a cloreto de sódio a 6,5% é demonstrada pelo crescimento. A tolerância ao sal é utilizada para diferenciação enterococos de não-enterococos.

Bacitracina (BAC): A sensibilidade a concentrações baixas de bacitracina é indicada pela ausência de crescimento e é característica de *Streptococcus pyogenes*.

Piruvato (PRV): A utilização de piruvato resulta na formação de ácidos. A diminuição do pH resultante é detectada através do indicador vermelho de fenol, que fica amarelo.

β-lactamase (BL): A presença de β-lactamase é demonstrada através da adição de penicilina e iodo ao poço BL. A quebra do anel β-lactâmico forma locais de ligação que são mais competitivos para o iodo do que as moléculas de amido. Se estiver presente β-lactamase, o iodo liga-se ao anel β-lactâmico para formar uma reação incolor. Se não estiver presente β-lactamase, o iodo combinar-se-á com as moléculas de amido e forma uma cor azul-preto.⁶

NOTA: Para os painéis que não possuem um poço de β-lactamase (BL), pode efectuar-se um teste da β-lactamase com base em nitrocefina.³⁰

Hemólise (HEM): As estreptococinas S e O, que são produzidas por estreptococos, provocam uma lise completa ou parcial dos glóbulos vermelhos em placa de gelose contendo sangue de ovelha.

3. Identificação do organismo

O Livro de Códigos dos Biótipos de Gram Positivos Desidratados MicroScan® é utilizado para a identificação de microrganismos de teste desconhecidos. Este livro de códigos foi produzido a partir da própria base de dados da MicroScan. O Livro de Código de Gram Positivos proporciona a análise computacional de 27 testes para *Streptococcaceae* e 18 testes para *Micrococcaceae*. Estes testes são traduzidos num número de biótipo com 9 ou 6 dígitos, respectivamente. Consultar o livro de códigos quanto ao método de registar os resultados. Este livro de códigos regista a identificação do organismo e as probabilidades relativas. Todas as possibilidades estão impressas na ordem de maior probabilidade, até um total cumulativo de 99,9%. O livro de códigos está dividido em 2 secções: *Micrococcaceae* e *Streptococcaceae*. Se surgir um número de biótipo que não possa ser localizado no livro de códigos, deve suspeitar-se em primeiro lugar de um erro de procedimento. Se os testes repetidos produzirem os mesmos resultados, telefonar para os Serviços Técnicos.

B. Interpretação dos resultados de CIM

A sensibilidade é determinada por comparação da CIM de um organismo com o nível do agente antimicrobiano que pode ser atingido no sangue ou na urina. A tabela seguinte lista os critérios interpretativos conforme indicado no documento M100-S14 da NCCLS e no relatório de 2003 do Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Alguns destes diferem dos breakpoints interpretativos do fabricante especificados na edição de 2004 do Physicians' Desk Reference.

Breakpoints interpretativos *

Agentes Antimicrobianos	Abrev.	Sensível	Intermédio	Resistente
Amicacina-Estafilococos	Am	≤16	32	≥64
Amoxicilina/Clavulanato de K-Estafilococos	Aug	≤4/2	--	≥8/4
Ampicilina ¹	Am			
Estafilococos		≤0.25	--	≥0.5
<i>L. monocytogenes</i> ⁴		≤2	--	≥4
Enterococos		≤8	--	≥16
Estreptococos B-hemolíticos ^{3,4}		≤0.25	--	≥0.5
Estreptococos/S. bovis ⁵ Grupo D		≤0.25	0.5-4	≥8
Ampicilina/Subactam-Estafilococos	A/S	≤8/4	16/8	≥32/16
Aztreonam	Azi	≤2	4	≥8
Cefazolin ¹ -Estafilococos	Ctz	≤8	16	≥32
Cefepime ¹ -Estafilococos	Cpe	≤8	16	≥32
Cefotaxima ¹	Cft			
Estafilococos		≤8	16-32	≥64
Estreptococos ^{2,3}		≤0.5	1	≥2
Cefuroxime axetil (oral)-Estafilococos	Crm	≤4	8-16	≥32
Cefuroxime sódico (parenteral)-Estafilococos	Crm	≤8	16	≥32
Cefalotina ¹ -Estafilococos	Cf	≤8	16	≥32
Cloxacilina	C			
Todos os organismos gram positivos excepto spp. <i>Streptococcus</i>		≤8	16	≥32
Estreptococos ^{2,3}		≤4	8	≥16
Ciprofloxacina-Estafilococos e Enterococos	Cp	≤1	2	≥4
Clarithromicina	Cla	≤2	4	≥8
Clindamicina	Cd			
Estafilococos ¹		≤0.5	1-2	≥4
Estreptococos ^{2,3}		≤0.25	0.5	≥1
Eritromicina ¹	E			
Estafilococos e Enterococos		≤0.5	1-4	≥8
Fosfomicina ³ -Estafilococos	Fos	≤32	--	≥32
Ácido Fusídico ³ -Estafilococos	FA	≤2	16	≥32
Gatifloxacina	Gat			
Estafilococos		≤2	4	≥8
Estreptococos ^{2,3}		≤1	2	≥4
Gentamicina-Estafilococos	Gm	≤4	8	≥16
Imipenem-Estafilococos	Imp	≤4	8	≥16
Levofloxacina	Lvx	≤2	4	≥8
Linezolid	Lzd			
Estafilococos ⁴		≤4	--	--
Enterococos		≤2	4	≥8
Estreptococos ^{2,3,4}		≤2	--	--
Meropenem-Estafilococos	Mer	≤4	8	≥16
Moxifloxacina ⁴ -Estafilococos	Mxf	≤2	4	≥8
Moxifloxacina ⁷	Mxf			
Estafilococos		≤0.12	0.5-2	≥4
Enterococos		≤0.5	1-2	≥4
Mupirocina ⁸	Mup			
Estafilococos (tópico)		≤4	--	≥8
Estafilococos (nasal)		≤256	--	≥512
Nitrofurantoina-Estafilococos	Nt	≤8	16	≥32

Nitrofurantoina-Estafilococos e Enterococos	Fd	≤32	64	≥128
Norfloxacina-Estafilococos e Enterococos	Nxm	≤4	8	≥16
Oloxacina-Estafilococos e	Ofi			
Apenas Estreptococos β-hemolíticos		≤2	4	≥8
Oxacilina-Estafilococos negativos para a coagulase	Ox	≤0.25	--	≥0.5
<i>S. aureus</i>		≤2	--	≥4
Pefloxacin ⁹ -Estafilococos	Pef	≤1	2-4	≥8
Penicilina G	P			
Estafilococos ¹		≤0.12	--	≥0.25
<i>L. monocytogenes</i> ⁴		≤2	--	≥4
Enterococos ¹		≤8	--	≥16
Estreptococos B-hemolíticos ^{3,4}		≤0.12	--	≥0.25
Estreptococos / <i>S. bovis</i> ⁵ Grupo D		≤0.12	0.25-2	≥4
Piperacilina/Tazobactam-Estafilococos	P/T	≤8/4	--	≥16/4
Rifampina-Estafilococos e Enterococos	Rif	≤1	2	≥4
Sinergina ¹⁰	Syn	≤1	2	≥4
Teicoplanina-Estafilococos e Enterococos	Tei	≤8	16	≥32
Tetraciclina	Te			
Todos os organismos gram positivos excepto spp. <i>Streptococcus</i>		≤4	8	≥16
Estreptococos ^{2,3}		≤2	4	≥8
Tobramicina-Estafilococos	To	≤4	8	≥16
Trimetoprim/Sulfametoxazol-Estafilococos	T/S	≤2/38	--	≥4/76
Vancomicina ¹	Va			
Todos os organismos gram positivos excepto spp. <i>Streptococcus</i>		≤4	8-16	≥32
Estreptococos ^{2,3,4}		≤1	--	--

* Baseado nos Breakpoints Interpretativos conforme indicado no Documento M100-S14 da NCCLS. Há agentes antimicrobianos incluídos neste painel que não está provado serem seguros e eficazes no tratamento de infecções clínicas para todos os organismos testados. Para comunicações sobre resultados de agentes antimicrobianos que mostraram ser activos contra grupos de organismos *in vitro* ou em infecções clínicas, consultar o M100 da NCCLS, Tabelas 1 e 2 ou o folheto farmacêutico informativo.

1. Difere do breakpoint do fabricante.
2. Os breakpoints da NCCLS para spp. *Streptococcus* existem só para os indicados. Reportar apenas para estreptococos (*S. bovis*) Grupo D compainéis MicroScan® Dried Gram Positivos.
3. Os pontos de corte NCCLS para *Streptococcus* spp. existem apenas para os antimicrobianos que estão indicados. Reportar apenas os estreptococos Grupo B (*S. agalactiae*) compainéis MicroScan® Dried Gram Positivos.
4. A ausência de estirpes de resistentes impede a NCCLS de, no momento, definir quaisquer categorias de resultados além de "sensível". As estirpes que originam resultados sugestivos de uma categoria "não-sensível" devem ser submetidas a um laboratório de referência para testes adicionais.
5. Com base nos Breakpoints Interpretativos indicados no relatório de 2003 do Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).⁴⁰
6. Baseado nos breakpoints do fabricante.
7. Baseado nos normas Mensura.⁴¹

Despiste sinérgico com gentamicina e estreptomina

Na endocardite por enterococos, a utilização isolada de penicilina ou ampicilina resulta em insucessos frequentes do tratamento. Quando os enterococos são sensíveis a níveis elevados de estreptomina ou gentamicina *in vitro*, a adição deste agente antimicrobiano à penicilina ou ampicilina é sinérgica e correlaciona-se clinicamente com uma taxa de cura melhorada.^{27,28} De acordo com o Documento M7-A6 da NCCLS, o método recomendado para a detecção de resistência de alto nível a aminoglicosídeos (HLAR) para microdiluição do caldo é como se segue:

Agente Antimicrobiano	Meio	Incubação	Concentração
Gentamicina	BHI*	24 horas	500 µg/ml
Estreptomina	BHI*	24 - 48 horas	1000 µg/ml

*Foram obtidos resultados comparáveis em testes limitados com caldo de fosfato de dextrose.

O desempenho dos despistes sinérgicos com gentamicina e estreptomina nos painéis da MicroScan® foi comparado com os métodos de referência de microdiluição recomendados pela NCCLS. Qualquer prova de turvação deve ser considerada crescimento ou reincubada para confirmar os resultados. Os resultados obtidos com a sinergia com gentamicina após 18 horas de incubação foram comparáveis com aqueles obtidos às 24 horas com o método de referência. Para uma melhor detecção da resistência com o despiste sinérgico com estreptomina, os painéis da MicroScan® devem ser incubados durante 24 a 48 horas.

Poço de crescimento sem timidina

Algumas bactérias necessitam de timidina para crescer. Estas bactérias poderão exibir uma falsa sensibilidade às sulfonamidas devido à presença de timidina-fosforilase no caldo Mueller-Hinton. Se um organismo não crescer no poço TFG, não se deve registar uma CIM para T/S e Sx.

Limitações do procedimento

1. Os painéis MicroScan® para Gram Positivos não devem ser utilizados para determinar as sensibilidades de isolamentos de estreptococos, com excepção de estreptococos Grupo B (*S. agalactiae*) e estreptococos Grupo D (*S. bovis*). Estes isolamentos devem ser testados usando um método aceite como o painel MicroSTREP™ da MicroScan®.
2. A NCCLS Document M7 recomenda a utilização do meio de Mueller Hinton suplementado com sangue de cavalo para testar estreptococos fastidiosos. Os procedimentos para a utilização de painéis desidratados para Gram Positivos MicroScan® difere desta recomendação. Se há um crescimento inadequado no poço de controle de crescimento, os resultados de CIM para os estreptococos do Grupo B (*S. agalactiae*) e estreptococos do Grupo D (*S. bovis*) não são válidos devendo ser utilizado um método alternativo.
3. Os painéis desidratados para Gram Positivos da MicroScan® podem ser utilizados para identificar estreptococos fastidiosos. Se o crescimento no poço de controle de crescimento for inadequado, os resultados bioquímicos não são válidos devendo usar-se um método alternativo.
4. Bactérias Anaeróbias - Os painéis Combo Positivos/CIM Positivos não são adequados para testar cocos anaeróbios gram positivos.
5. Pode ser necessário efectuar testes adicionais para determinar a identificação final quando se obtém uma identificação de baixa probabilidade (<85%) (consultar o Livro de Códigos dos Biótipos de Organismos Gram Positivos Aeróbios MicroScan® ou o Manual de Microbiologia).
6. As CIM de penicilina para estafilococos coagulase negativa podem não ser úteis na previsão da resistência devido à β-lactamase. Assim, deve efectuar-se um teste da β-lactamase para confirmar a CIM. Foi mostrado que estirpes de *S. saprophyticus* com CIM de Penicilina de 1-2 µg/ml não produzem β-lactamase; assim, a ampicilina, a amoxicilina ou a penicilina podem ser o fármaco de eleição para infecções do tracto urinário com estes organismos.
7. Pode ocorrer uma ligeira névoa em poços aleatórios de alguns agentes antimicrobianos devido à solubilidade incompleta de alguns constituintes dos meios. Esta situação não deve ser interpretada como crescimento.
8. A interpretação dos resultados dos testes exige a intervenção de pessoal clínico treinado com capacidade de avaliação e conhecimentos, assim como a execução de testes de confirmação adicionais, quando necessário, antes de se aceitar a identificação de um organismo.
9. Os números dos biótipos não devem ser utilizados para a identificação de fenótipos de estirpes isoladas a partir de diversas amostras colhidas no mesmo doente.
10. Os resultados obtidos com as combinações de organismo/agente antimicrobiano enumeradas abaixo mostraram CIM discrepantes quando comparados com um método de referência overnight. Se o agente antimicrobiano for crítico para o tratamento do doente, deve utilizar-se um procedimento alternativo, ou então o agente antimicrobiano não deve ser referido devido a uma baixa correlação.

8.2 ANEXO 2 – Folha de leitura para DADE MicroScan® para gram positivos com esquema da placa

MicroScan® - Pos MIC 21 (PM21 for reference only)

Rev.4

B1016-106

C	G	TFG	LOC	500 GmS	1000 Sts	2	4	8 Gm	2	4	8 Te
4	8	16 Nt.	0.5	1	2 Cp	0.5	2	4 Lvx	1	2	4 Gat
0.12	0.5	1	2 Mxf	0.5	1	8	16	32 Cft	4	8	16 C
32	64 Fd	32	64 Fos	0.5	1	2 Rif	1	2	4	8	16 Tei
0.5	1	2 Syn	0.5	1	2	4 Azi	1	2	4	8	16 Va
1	2	4 Lzd	0.25	0.5	1	2 Cd	0.25	0.5	1	2	4 E
0.25	0.5	4	8 Am	2	16 FA	0.25	0.5	1	2	4 Ox	2/38 T/S
2/1	4/2 Aug	0.03	0.06	0.12	0.25	2	4	8 P	4	8	256 Mup

	Antimicrobial Agents	Dilutions		Antimicrobial Agents	Dilutions
Aug	Amoxicillin/K Clavulanate	2/1-4/2	Lzd	Linezolid	1-4
Am	Ampicillin	0.25-0.5, 4-8	Mxf	Moxifloxacin	0.12, 0.5-2
Azi	Azithroycin	0.5-4	Mup	Mupirocin	4-8, 256
Cft	Cefotaxime	0.5-1, 8-32	Nt	Netilmicin	4-16
C	Chloramphenicol	4-16	Fd	Nitrofurantoin	32-64
Cp	Ciprofloxacin	0.5-2	Ox	Oxacillin	0.25-4
Cd	Clindamycin	0.25-2	P	Penicillin	0.03-0.25, 2-8
E	Erythromycin	0.25-4	Rif	Rifampin	0.5-2
Fos	Fosfomycin	32-64	Sts	Streptomycin Synergy Screen	1000
FA	Fusidic Acid	2, 16	Syn	Synercid	0.5-2
Gat	Gatifloxacin	1-4	Tei	Teicoplanin	1-6
Gm	Gentamicin	2-8	Te	Tetracycline	2-8
GmS	Gentamicin Synergy Screen	500	T/S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38
Lvx	Levofloxacin	0.5, 2-4	Va	Vancomycin	1-16

8.3 ANEXO 3 – Artigo Publicado “Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats”

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

of trimethoprim- and sulfamethoxazole-resistant UPEC. In a study of isolates in Chicago using PFGE, Petrof et al. [8] found that trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant isolates were unrelated. Studies of isolates from Europe have also shown a low frequency (5–7%) of similarity between isolates [1,3]. Horizontal transfer of common resistance determinants amongst *E. coli* strains appears likely to be more important than dissemination of a closely related clonal group in maintaining high rates of trimethoprim and sulfamethoxazole resistance in this region.

References

- [1] Moreno E, Prats G, Sabate M, Perez T, Johnson JR, Andreu A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:204–11.
- [2] Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* 2001;345:1007–13.
- [3] Johnson JR, Murray AC, Kuskowski MA, et al. Trans-Global Initiative for Antimicrobial Resistance Analysis (TIARA) Investigators Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg Infect Dis* 2005;11:141–5.
- [4] France AM, Kugeler KM, Freeman A, et al. Clonal groups and the spread of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2005;40:1101–7.
- [5] NiChulain M, Murray AM, Corbett-Feeney G, Cormican M. Antimicrobial resistance in *E. coli* associated with urinary tract infection in the West of Ireland. *Irish J Med Sci* 2005;174:2–6.
- [6] NiChulain M, Morris D, Cormican M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction for typing of uropathogenic *Escherichia coli* is not what it seems. *Clin Infect Dis* 2006;42:1805–6.
- [7] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382–9.
- [8] Petrof EO, Schwartz DN, Quinn JP. Urinary tract infections and a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* 2002;346:535–6.

Dearbhaile Morris*
Martina Ni Chulain
Martin Cormican

Department of Bacteriology, Clinical Science Institute,
National University of Ireland, Galway, Galway, Ireland

*Corresponding author. Tel.: +353 91 544652;
fax: +353 91 495514.

E-mail address: Dearbhaile.morris@nuigalway.ie
(D. Morris)

22 February 2007

Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats

Sir,

Enterococci are commensal bacteria of the gastrointestinal tract of animals and man, however their importance in nosocomial infections is increasing. Two species are responsible for the majority of infections, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Enterococci are intrinsically resistant to cephalosporins, penicillinase-resistant penicillins, polymyxins, low concentrations of aminoglycosides, clindamycin, fluoroquinolones, streptogramins (*E. faecalis*) and trimethoprim/sulfamethoxazole. Furthermore, penicillin, vancomycin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline and high-level aminoglycoside resistance has been increasingly reported [1]. We studied the antimicrobial susceptibility patterns among veterinary clinical enterococci isolated in Portugal from dogs ($n=37$) and cats ($n=18$) with urinary tract infection ($n=40$), otitis externa ($n=11$) and pyoderma ($n=4$) between 1998 and 2006. Two different methods, disk diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC) determination, were compared for the detection of penicillin-, ampicillin-, vancomycin- and high-level aminoglycoside-resistant veterinary clinical strains. Isolates were identified to species level using the BBL Crystal Gram-Positive ID System®. Susceptibility testing was performed using the disk diffusion method and the microdilution assay for MIC determination (in-house MIC microdilution and Dade MicroScan® panels). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 was used as a reference control strain. Susceptibility patterns were interpreted according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [2,3].

Enterococcus faecalis was the predominant species isolated (83.6%; $n=46$) followed by *Enterococcus faecium* (10.9%; $n=6$); other species isolated (*Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus hirae*) accounted for 5.5% ($n=3$). Susceptibility was high (95.5%) to penicillin ($MIC_{90}=2 \mu\text{g/mL}$) and ampicillin ($MIC_{90}=4 \mu\text{g/mL}$), in contrast with reports from the USA [4,5]. Susceptibility was also high to nitrofurantoin (83.6%) ($MIC_{90}=64 \mu\text{g/mL}$) and chloramphenicol (69.1%) ($MIC_{90}>16 \mu\text{g/mL}$). Resistance was high to tetracycline (67.3%) ($MIC_{90}>8 \mu\text{g/mL}$) and erythromycin (50.9%) ($MIC_{90}>4 \mu\text{g/mL}$). As expected [6], very high resistance to quinupristin/dalfopristin was found (87.3%) ($MIC_{90}>2 \mu\text{g/mL}$). None of the isolates were resistant to vancomycin, teicoplanin or linezolid. Resistance values for fluoroquinolones were 45.5% for ciprofloxacin ($MIC_{90}>2 \mu\text{g/mL}$) and 41.8% both for levofloxacin ($MIC_{90}>4 \mu\text{g/mL}$) and moxifloxacin ($MIC_{90}>2 \mu\text{g/mL}$). Seven high-level gentamicin-resistant (HLGR) isolates ($MIC \geq 500 \mu\text{g/mL}$) (12.7% of all isolates) and 20 high-level streptomycin-resistant (HLSR) isolates ($MIC \geq 1000 \mu\text{g/mL}$) (36.4% of all isolates) were detected. Six isolates (10.9%) presented combined streptomycin and gentamicin resistance.

Table 1

Comparison of results obtained by disk diffusion and minimal inhibitory concentration (MIC) methods, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (M100-S15) and veterinary CLSI (M31-A2) breakpoints

Antibiotic	No. of errors			% category agreements ^d	% essential agreements ^e
	mE ^a	ME ^b	VME ^c		
Gentamicin 10 µg	6	37	0	21.8	32.7
Gentamicin 120 µg	0	0	0	100.0	100.0
Streptomycin 10 µg	1	34	0	36.4	38.2
Streptomycin 300 µg	2	1	1	92.7	96.4
Penicillin 10 U	0	2	0	96.4	96.4
Ampicillin 10 µg	0	1	0	98.2	98.2
Vancomycin 30 µg	27	15	0	23.6	72.7
All	36	90	1	–	–
% for all tests	9.4	23.4	0.3	67.0	76.4

^a mE, minor error: indicates that isolates were intermediate by one method and resistant or susceptible by the other.

^b ME, major error (false resistance): indicates that isolates were resistant by disk diffusion and susceptible by the reference method (MIC).

^c VME, very major error (false susceptibility): indicates that isolates were susceptible by disk diffusion and resistant by the reference method (MIC).

^d Category agreement means that strains are classified in the same category by both methods.

^e Essential agreement means that there were minor errors only.

All seven HLGR isolates were equally detected by both methods (high-content gentamicin disks and MIC). Among the 20 HLSR isolates, four were differently classified by high-content streptomycin disks and MIC methods, as shown in Table 1. Gentamicin and streptomycin 10 µg disks were not reliable in predicting high-level resistance, as numerous strains were classified by disk diffusion as resistant or intermediate but were in fact susceptible by MIC determination. Category and essential agreements between the two methods were poor both for gentamicin and streptomycin 10 µg disks. Furthermore, it appears that not all clinical enterococci isolates have intrinsic low-level resistance to gentamicin. Five gentamicin-susceptible strains (MIC=2 µg/mL) were detected by an in-house microdilution method. This is in agreement with the epidemiological cut-off value of ≤ 32 µg/mL related to the MIC distribution of wild-type enterococci determined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [7]. High-content gentamicin disks provided 100% concordant results with MIC determination. High-content streptomycin disks presented category and essential agreements of 92.7% and 96.4%, respectively. These results suggest that routine use of high-content aminoglycoside disks should be applied in veterinary clinical microbiology. All penicillin-resistant strains by MIC were ampicillin resistant (5.5%). The same was also true for the β -lactam-susceptible strains. However, differences were observed: for penicillin, MIC classified two strains as susceptible and disk diffusion as resistant; for ampicillin, a 'major error' was also observed. The present results confirm the need to test both ampicillin and penicillin. Disk diffusion showed unacceptable results in detecting enterococci resistance to vancomycin. We observed only one true intermediate isolate, confirmed by both methods. From the 54 strains determined as susceptible by MIC, 15 were categorised as resistant, 27 as intermediate and only 12 as susceptible by disk diffusion, precluding the use of disk diffusion for the detection of vancomycin-resistant enterococci.

Therefore, glycopeptide susceptibility testing should be performed by the MIC method in veterinary medicine.

Fortunately, our clinical enterococcal isolates remain highly susceptible to ampicillin and penicillin. In our experience, even with high-level aminoglycoside-resistant strains, infections may be controlled with modifications of the ampicillin dosing regimen (interval shortening and higher dosage). This is of importance in avoiding the extralabel use of human-licensed drugs. Our findings contribute to the refinement of future therapeutic decisions in the management infections by enterococci of companion animals. Furthermore, the location of genes encoding resistance to antibiotics on mobile elements as well as the use of the same antimicrobial substances in human and companion animals might favour the transfer of resistance genes from animal to human microbiota. These facts, as well as the close contact between pets and their owners, strengthen the need to promote further studies and for regular epidemiological surveillance.

Acknowledgment

Marlene Delgado was supported by a grant from Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

References

- [1] Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000;13:686–707.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd ed. Approved standard M31-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16. Wayne, PA: CLSI; 2006.

- [4] Simjee S, White DG, McDermott PF, et al. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J Clin Microbiol* 2002;40:4659–65.
- [5] Thal LA, Chow JW, Mahayni R, et al. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2112–5.
- [6] Singh K, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin–dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;46:1845–50.
- [7] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial wild type MIC distributions of microorganisms. 2006. http://www.srga.org/eucastwt/WT_EUCAST.htm [accessed 29 January 2007].

Marlene Delgado

Isabel Neto

José Henrique Duarte Correia

Constança Pomba*

CIISA, Faculty of Veterinary Medicine,

Universidade Técnica de Lisboa, Av. Da

Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

*Corresponding author. Tel.: +351 21 365 2837;

fax: +351 21 365 2897.

E-mail address: cpomba@fmv.utl.pt

(C. Pomba)

27 February 2007

doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.03.007

8.4 ANEXO 4 – Abstract da comunicação oral “Detection and clinical implication of high-level aminoglycoside resistance among clinical enterococci strains isolated from pets”

Detection and clinical implication of high-level aminoglycoside resistance among clinical enterococci strains isolated from pets

M. Delgado¹, A. Peixoto¹, M. Costa¹, B. Baptista¹, J. H. Duarte Correia¹ and C. Pomba¹

¹ CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, UTL, Lisbon, Portugal

Introduction Enterococci are important pathogens in which multidrug resistance is common and often presents a treatment problem. The use of a β -lactam (cell-wall active agent) with an aminoglycoside is usually the combined therapy of choice in serious enterococcal infections. The emergence in veterinary medicine of an increasing number of high-level resistant gentamicin and streptomycin enterococci strains led to the *in vivo* synergy loss of combined β -lactam-aminoglycoside therapy (1). This study was performed to: i) evaluate penicillin (P), ampicillin (AMP), gentamicin (CN) and streptomycin (S) *in vitro* efficacy by disc diffusion (DD) and minimal inhibitory concentrations (MIC) methods, ii) compare different methods of detection of high-level aminoglycoside resistant strains.

Materials and Methods Forty-eight enterococci were isolated from dogs and cats with urinary tract infection (UTI), otitis externa (OE) and pyoderma. Isolates were identified at species level using BBL Crystal Gram Positive ID System® (Becton Dickinson, Meylan, France). Susceptibility testing was performed using DD method (10, 120 and 500 μ g CN discs, 10 and 300 μ g S discs, 10U P and 10 μ g AMP discs) and MIC determination (in-house microdilution for CN; DADE MicroScan® - Dade Behring, Lisbon, Portugal- panels for P, AMP, CN and S) according to standard procedures. Clinical and Laboratory Standards Institute (M31-A2 and M100-S15) and Société Française de Microbiologie (2005) breakpoints were applied. High-level resistant strains (HLR) were identified using DADE MicroScan MIC panels (synergy test for CN 500 μ g and S 1000 μ g).

Results *Enterococcus faecalis* was the predominant species isolated ($n=39$), followed in frequency by *Enterococcus faecium* ($n=7$). Six high-level gentamicin resistant (HLGR) isolates were equally detected by all the methods (DD, MIC and DADE) (Table 1). Five of them showed also high-level streptomycin resistance (HLSR). Among the 18 HLSR detected isolates, only one was differently classified by DD and DADE methods (Table 1). A perfect concordance occurred in HLGR detection by all methods, including the different methodologies proposed by U.S.A. and French guidelines. We also observed concordance between susceptibility results towards AMP by DD and DADE. For penicillin, there were two strains that showed different results, MIC classified them as susceptible and DD as resistant. All the penicillin-resistant strains by MIC were also AMP-resistant (6.25%). The same was also true for the β -lactam-susceptible strains.

Table 1. Comparison of methods for the detection of high-level aminoglycoside (HLR) resistant enterococci strains

HLR	Disc diffusion (zone diameter)												CN MIC (μ g/ml)		
	CN 10 μ g ^a			CN 120 μ g ^a			CN 500 μ g ^a			S 10 μ g ^a			S 300 μ g ^a		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Gentamicin															
Positive ($n=6$)	6	0	0	6	0	0	6	0	0	-	-	-	-	-	-
Negative ($n=42$)	34	5	3	0	0	42	0	0	42	-	-	-	-	-	-
Streptomycin															
Positive ($n=18$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	0	0	17	0	1
Negative ($n=30$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	0	0	0	1	29

^a A true positive result is an isolate classified as resistant by the respective breakpoints. ^b Breakpoint for low-level resistance. ^c *Enterococcus* with MICs = 128 μ g/ml may be HLGR (2). ^d Breakpoint for high-level resistance.

Discussion To our knowledge this is the first study on the evaluation of High Content Aminoglycoside Discs (HCAD) for the detection of HLR among veterinary enterococcal isolates. CN 10 μ g discs are not reliable to predict HLGR because some strains are in fact low-level resistant. Furthermore, not all enterococcal clinical isolates have intrinsic low-level resistance as otherwise reported (2). All the three methods studied for detection of high level aminoglycoside resistance presented concordant results. Thus, we believe that the routine use of HCAD should be considered in veterinary microbiology laboratories. The present study confirmed previous reports in what concerns the need to test both ampicillin and penicillin in order to detect resistance of enterococci to β -lactams (3). Fortunately, enterococci isolated from pets presented a small frequency of resistance to this antibiotic family. As the presence of HLR strains may affect the therapeutic decision, susceptibility testing should be done before initiating combined antimicrobial therapy. Emergence of HLR enterococcal strains associated with serious infections among small animals is a concerning problem that may compromise antimicrobial therapy efficacy.

References

1. Pomba et al. Clin Microbiol Infect 2006; 12; S4; 2. Lopes et al. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 214-219; 3. Kaçmaz and Aksoy. Inter J Antimicrob Agents 2005; 25: 535-538

8.5 ANEXO 5 – Abstract da comunicação oral “Antimicrobial resistance of uropathogenic enterococci isolated from pets in Portugal”

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF UROPATHOGENIC ENTEROCOCCI ISOLATED FROM PETS IN PORTUGAL

M. Delgado¹, A. Peixoto¹, J. H. Duarte Correia¹ and C. Pomba¹. ¹ CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, UTL, Lisbon, Portugal

Enterococci are important pathogens in which multidrug resistance is common and often presents a treatment problem. They are intrinsically resistant to several antimicrobial agents and also have the ability to acquire resistance to others. Penicillin, vancomycin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline and high-level aminoglycoside resistance has been increasingly reported. For this reason, antimicrobial resistance in enterococci is now a major concern. The aim of this study was to characterize the antimicrobial susceptibility patterns of pathogenic enterococci isolated from urinary tract infections of pets, in Portugal. Forty-two enterococci were isolated from dogs ($n=21$) and cats ($n=21$) with urinary tract infection, between January 1998 and March 2007, at the Veterinary Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and at veterinary private practices in the Lisbon area. Isolates were identified at species level using BBL Crystal Gram Positive System®. Minimal inhibitory concentrations were determined by DADE MicroScan® panels and interpreted according to the recommendations of NCCLS. *Enterococcus faecalis* was the predominant species isolated (85.7%), followed in frequency by *Enterococcus faecium* (9.5%). None of the isolates was resistant to vancomycin, teicoplanin or linezolid, drugs of choice in the treatment of enterococcal human nosocomial infections. Our isolates remain highly susceptible to penicillin and ampicillin (92.9%). Susceptibility was also high towards nitrofurantoin (83.3%) and chloramphenicol (64.3%). Resistance was high towards quinupristin-dalfopristin (92.9%), tetracycline (71.4%) and erythromycin (52.4%). Fluoroquinolones also presented a very high resistance rate: 57.1% for ciprofloxacin and 52.4% for levofloxacin and moxifloxacin. Six (14.3%) high-level gentamicin resistant isolates and thirteen (31.0%) high-level streptomycin resistant isolates were detected. Five (11.9%) presented combined streptomycin and gentamicin resistance. High-level aminoglycoside resistance is a concerning problem that may compromise combined antimicrobial therapy efficacy (β -lactam in association with an aminoglycoside). However, in our experience, these infections may be controlled with ampicillin dosing regimen modifications (interval shortening and higher dosage). This is of relevant importance in avoiding the extra-label use of human licensed drugs. Furthermore, the location of genes encoding resistance to antibiotics on mobile elements and the use of the same antimicrobial substances in human and companion animals might favor the transfer of resistance genes from animal to human microbiota. These facts and the close contact between pets and their owners strengthen the need to promote further studies and regular epidemiological surveillance.

8.6 ANEXO 6 – Abstract da comunicação oral “Antimicrobial Resistance and Detection of High-level Aminoglycoside Resistance Among Enterococci Isolated From Pets in Portugal”

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND DETECTION OF HIGH-LEVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE AMONG ENTEROCOCCI ISOLATED FROM PETS IN PORTUGAL

M. Delgado¹, B. Coelho Baptista¹, J.H. Duarte Correia¹, C. Pomba¹. ¹ CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Portugal

Enterococci are important pathogens in which multidrug resistance is common and often presents a treatment problem. They are intrinsically resistant to cephalosporins, penicillinase-resistant penicillins, polymyxins, low concentration of aminoglycosides, clindamycin, fluoroquinolones, streptogramins (*E. faecalis*) and trimethoprim/sulfamethoxazole. Furthermore, penicillin, vancomycin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline and high-level aminoglycoside resistance has been increasingly reported (Delgado *et al.* 2007). For this reason, antimicrobial resistance in enterococci is now a major concern. The aim of this study was to characterize the antimicrobial susceptibility patterns of pathogenic enterococci isolated from pets, in Portugal, and to detect high-level aminoglycoside resistance (HLAR). Sixty-eight enterococci were isolated from dogs ($n=42$) and cats ($n=26$), between January 1998 and December 2008, at the Veterinary Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and at veterinary private practices in the Lisbon area. Isolates were identified at species level using BBL Crystal Gram Positive System®. Susceptibility testing was performed using disc diffusion method and DADE MicroScan® panels. CLSI breakpoints were applied. *Enterococcus faecalis* was the predominant species isolated (86.8%), followed in frequency by *Enterococcus faecium* (8.8%). None of the isolates was resistant to vancomycin, teicoplanin or linezolid, drugs of choice in the treatment of enterococcal human nosocomial infections. Our isolates remain highly susceptible to penicillin (92.6%) and ampicillin (95.6%). Susceptibility was also high towards nitrofurantoin (79.5%). One *E. faecium* was susceptible to quinupristin-dalfopristin. Resistance was important to tetracycline (72.1%) and fluoroquinolones (44.1% for ciprofloxacin and 45.6% for enrofloxacin). Eight high-level gentamicin resistant isolates (11.8%) and twenty-three high-level streptomycin resistant isolates (33.8%) were detected. Seven (10.3%) presented combined streptomycin and gentamicin resistance. HLAR is a concerning problem that may compromise combined synergic antimicrobial therapy efficacy (β -lactam in association with an aminoglycoside). However, in our experience, these infections may be controlled with high ampicillin dosing regimen modifications (interval shortening and higher dosage). This is of relevant importance in avoiding the extra-label use of human licensed drugs. Furthermore, the location of genes encoding resistance to antibiotics on mobile elements and the use of the same antimicrobial substances in human and companion animals might favor the transfer of resistance genes from animal to human microbiota. These facts and the close contact between pets and their owners strengthen the need to promote further studies and regular epidemiological surveillance.

8.7 ANEXO 7 – Comparação dos resultados obtidos pelos métodos microdiluição em meio Müller-Hinton-Broth *versus* microdiluição com recurso a DADE MicroScan[®] para gram positivos

Identificação das estirpes	Microdiluição em Müller-Hinton-Broth		DADE MicroScan [®] para gram positivos (Gms)
	CIM (µg/ml)	Avaliação	
16/98	4	S	neg
33/98	4	S	neg
53/02	2048	R	pos
82/99	8	S	neg
95/99	4	S	neg
162/05	4	S	neg
344/99	2048	R	pos
337/03	2048	R	pos
434/00	4	S	neg
522/05	8	S	neg
591/00	8	S	neg
658/02	16	S	neg
1213/02	8	S	neg
1420 C/05	2048	R	pos
1445/02	8	S	neg
1539/03	8	S	neg
1873/01	2	S	neg
1903/02	2	S	neg
1918 C/05	8	S	neg
2069 B/05	16	S	neg
2336/05	4	S	neg
2479/02	8	S	neg
2482/02	8	S	neg
2622/03	8	S	neg
3031/03	8	S	neg
3179/03	8	S	neg
3201/02	4	S	neg
3341/03	64	S	neg
3456/02	8	S	neg
3501/02	8	S	neg
3626/03	1024	R	pos
3671/02	8	S	neg
3782/03	4	S	neg
3924/02	32	S	neg
4079/03	16	S	neg
427905	16	S	neg
5035/04	8	S	neg
5106 B/04	16	S	neg
5633/05	16	S	neg

Identificação das estirpes	Microdiluição em Mueller-Hinton-Broth		DADE MicroScan [®] para gram positivos (Gms)
	CIM (µg/ml)	Avaliação	
5836/04	8	S	neg
6374 B/04	4	S	neg
6629 B/04	16	S	neg
376 1/06	nd	nd	neg
376 2/06	nd	nd	neg
1373/06	nd	nd	neg
3671/03	nd	nd	neg
2355/06	nd	nd	neg
267/00	nd	nd	neg
1678/01	nd	nd	neg
1958/01	nd	nd	neg
2995 B/06	nd	nd	neg
6735/06	nd	nd	pos
6736 B/06	nd	nd	pos
174/07	nd	nd	neg
369/07	nd	nd	neg
896/07	nd	nd	neg
1558/07	nd	nd	neg
1879A/07	nd	nd	neg
3333 A/07	nd	nd	neg
3463/07	nd	nd	neg
6643/07	nd	nd	nd ^a
7175/07	nd	nd	pos
4130/08	nd	nd	nd ^a
3920 A/08	nd	nd	nd ^a
3885 A/08	nd	nd	neg
2370/08	nd	nd	neg
812/08	nd	nd	neg

Gms: teste sinergia da gentamicina; nd: não realizado; pos: teste positivo (resistente); neg: teste negativo (sensível); ^a determinação da susceptibilidade realizada apenas pelo método de difusão em disco (CN 120µg).